VOLUMEN 10 JULIO-SEPTIEMBRE 1957 NUM. 3

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CSIC
RAM
MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Excmo. Sr. D. Arnaldo Socías Amoros (†), por *J. del Campo Lawday* 251

«Cromosomas ligados» y «Mitosis elementales» en los núcleos de *Aspergillus*, por *A. Socías* (†) y *C. Ramírez Gómez* 259

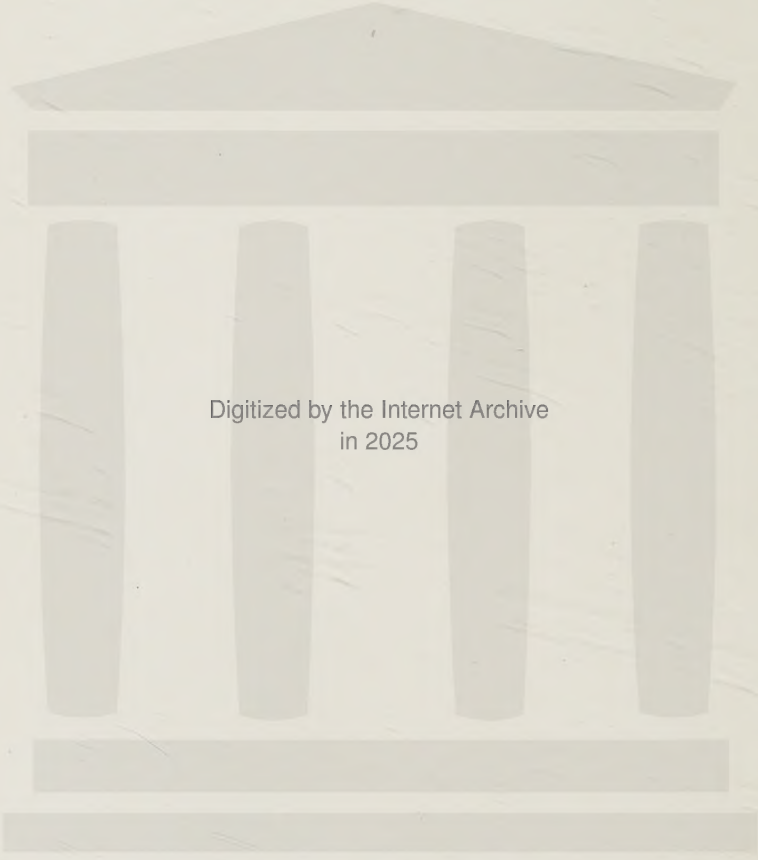
Contribución al estudio de la microbiología de los embutidos, por *A. Socías* (†) y *J. Pérez Silva*... ... 287

Citología y ciclos vitales del género *Rhizobium* Frank, por *Miguel Rubio Huertos* y *Genoveva Tejerina Domínguez* 305

Influencia del pH y la salinidad en el desarrollo de *Lactobacillus plantarum*, por *Antonio Izquierdo Tamayo* 325

Estudio bacteriológico de la putrefacción en la merluza, por *Genoveva Tejerina Domínguez* 345

Excmo. Sr. D. Arnaldo Socías Amorós †


Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_july-september-1957_10_3

Parece imposible de creer; todos rechazan como un absurdo la noticia al conocerla y, sin embargo, es cierta. Ha fallecido el profesor Arnaldo Socías Amorós.

Para los que con él hemos convivido durante años, día a día, aún nos resulta más difícil el hacernos a la idea de que no lo veremos más, tal como cotidianamente se nos manifestaba: juvenil de aspecto y concepto, trabajador en demasía, guía permanente y entusiasta para los que con él se formaban, caballero en sus acciones, buen compañero, buen amigo...

Quiero por ello con este breve recuerdo hacerme eco, en nombre de los que con él trabajamos en más estrecho contacto, del homenaje sincero de nuestra gratitud y de nuestro imperecedero afecto; y siquiera sea de una manera tosca y desmañada—que el sentimiento no se mide por la exquisitez literaria—, permítaseme que rememore fechas, hechos y datos que nos ayuden a revivir su memoria, para agrado de los que bien le quisimos e incentivo de los que pretendan seguir sus senderos.

Nace el profesor Socías en el recoleto Mahón de 1905, y en la misma capital balear permanece hasta finalizar los estudios de bachillerato; de su padre hereda el tesón y el amor al estudio, y de su madre la formación religiosa, y ni unos ni otra—por suerte para él—le abandonarían en el resto de su vida.

Ferviente amante de su patria chica y de su lengua vernácula (en la que gusta de charlar cuando un compatriota le da motivo sentimental para ello), es lo cierto que encuentra un poco limitada para sus ansias de expansión intelectual la ciudad menorquina, y pronto se desplaza a Barcelona, donde brillantemente cursa los estudios de la Facultad de Medicina, licenciándose en 1929 con la calificación de sobresaliente.

Más adelante le gustaría presumir de que él hubiera hecho un buen clínico, juzgando por sus incipientes éxitos de interno de la Facultad; pero nosotros estamos convencidos—sin quitarle méritos para aquéllo—de que con su extrema sensibilidad le hubiera resultado difícil el compaginarla con los rigores, a veces tan desagradables, de la práctica clí-

nica. En lo que probablemente tenía razón era en apreciar que sus diagnósticos resultaban, en general, acertados; pero no por lo que se ha dado en llamar «ojo clínico», sino porque al poner sus cinco sentidos en el estudio exhaustivo del caso que se tratara—investigación se llama esta figura—tenía un buen margen de probabilidades favorables.

Y, en efecto, su *modus faciendi* le lleva, casi sin pensarlo, a trabajar con gusto a las inmediatas órdenes del doctor Pedro Domingo, director a la sazón del Laboratorio Municipal de Barcelona, en la que había de ser en el futuro su más cara dedicación: la Microbiología. De resultas de esa definida vocación por la investigación de los seres más pequeños, y respaldado por su maestro, publica el primer trabajo en colaboración con él, destinado al primer Congreso Internacional de Microbiología, de París, 1930. Este trabajo lleva por título «Variaciones en los cultivos del *Pseudomonas piocianico*».

Desde él, hasta el último que ve la luz en esta misma revista—y pasan con mucho de las tres docenas el número de sus trabajos publicados—, exclusivamente es la Microbiología el eterno tema de sus investigaciones, pues hasta el único que por su título podía desmentir este aserto («Problemas sanitarios que plantea la aeronavegación», 1947) lleva en su contenido la obligada epidemiología tan de su agrado. ¿Cabe un caso más claro de vocación precoz y de continuidad en la misma?

En el año 1933 ingresa por oposición en el Cuerpo de Sanidad Nacional (otro de sus grandes amores), y siempre ansioso de saber más y más, consigue una beca de pensionado en el Instituto Pasteur de París, donde permanece hasta finales de 1934, trabajando—¿cómo no?—en medio de los mejores bacteriólogos mundiales, con los que estableció relaciones que ha mantenido siempre, en favor, principalmente, de sus educandos

A su regreso de París pasa destinado como sanitario a Murcia, donde, en lugar de dedicarse a un mero servicio rutinario, aprovecha la endemia tracomatosa para realizar una investigación a fondo, de orientación bacteriológica, que da como resultado una serie de publicaciones (casi todas en la «Revista de Sanidad e Higiene Pública») de gran contenido, que llaman poderosamente la atención. Hasta dieciséis trabajos creemos haber contado de esta especialidad, de los que solamente dos o tres presentan otro nombre acompañando al suyo; en los restantes, el familiar «A. Socías» es el único aparente. Por cierto, que una de estas monografías primeras fué la que sirvió de base para la redacción de su tesis doc-

toral, que obtuvo la nota de sobresaliente en la Facultad de Medicina de Madrid, casi al mismo tiempo (1940) en que lograba el premio «Obieta» de la Real Academia. Y esta dedicación intensiva al estudio del tracoma tuvo mucho que ver con que en 1944 ganara por oposición la Jefatura del Laboratorio, del Instituto Oftálmico Nacional.

Su nombramiento para profesor de la Escuela Nacional de Sanidad decidió inexorablemente su radicación en Madrid. Fué profesor auxiliar de la cátedra de Higiene de la Facultad de Medicina matritense en los años 1942-1946, y un poco después médico epidemiólogo de la Lucha Antitracomatosa, por oposición.

Al llegar a este momento de su vida, el doctor Socías inicia un nuevo rumbo de sus actividades al cursar la carrera facultativa de Ciencias Naturales, que corona con otra calificación de sobresaliente en el doctorado por la Universidad de Madrid en el año 1945. No es solamente su tradicional apetencia de saber lo que le guía, sino el deseo de poseer su disciplina más querida—la Microbiología—en su concepto más amplio, y no encastillada únicamente en el terreno médico, que es el que hasta entonces había ejercitado principalmente. Es decir, que aunque hablábamos antes de nuevo rumbo, mejor sería decir nueva variación sobre el mismo tema.

En el año siguiente, su ya ingente preparación le permite obtener por oposición la cátedra de Bacteriología de la Facultad antes citada; con ello, y merced a su autodidáctica preparación previa en la Higiene que antes explicaba, ejerce su función profesoral con las mejores garantías para la formación de sus alumnos, labor de enseñanza que ininterrumpidamente ejercitó a través de cátedras y de laboratorios, pues si de algo pecó—si pecado se puede llamar a estas hechuras—fué de prodigarse sin tasa en hacer comulgar de sus conocimientos a cuantos quisieron ser partícipes del festín. Y lo hacía lisa y llanamente, como una labor natural en él, lo mismo con los licenciados y doctores que a su vera trabajaban, como con los aprendices de Biología de Farmacia y Medicina, asignaturas que últimamente le fueron acumuladas a su jurisdicción intelectual.

Por todo ello, era lógico que culminara su carrera ascensional en el año 1950, en el que, en plena madurez científica, es encargado de la dirección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología del C. S. I. C. Si grande fué la labor que en este centro desarrolló hasta conseguir plasmarla en la realidad del edificio nuevo que actualmente disfrutamos, ¿qué

hubiera sido en un futuro inmediato con el paternal y constante apoyo del Patronato «Alonso de Herrera» del que el Instituto forma parte? El era incansable, decidido, con preparación ecuménica y entusiasmo sin límites que procuraba contagiar a cuantos le rodeábamos. ¿Dónde hubiera llegado este hombre con el Centro y los medios de que actualmente disponía?

Pues, por de pronto, a culminar seguramente su valiente teoría del ciclo vital moho-bacteria, sobre la que venía investigando sin desmayo y sin más pausas que las que la propia biología impone, desde el año de 1949, en que publicó su trabajo «Un hongo *(eumiceto)* se transforma en bacteria *(eschizomyceto)*» («Anales de Edafología y Fisiología Vegetal»).

No menos de diez trabajos—suyos y de sus colaboradores—han visto la luz en «Microbiología Española», en prueba del profundo estudio dedicado a este tema, y puede asegurarse que poseía material para publicar quizá otros tantos; si éstos no fueron vertidos al exterior, débese más bien a que en la maraña de sus complejísimas investigaciones le faltaba aún de hallar la «piedra filosofal» que pusiera en evidencia, de una manera concluyente y fácil de realizar, el estupendo hecho que él constataba con cierta frecuencia a través de su microscopio, con lo que los escépticos de su teoría se hubieran convencido de la certeza de ella.

Testigos somos, de todas maneras, de la elevada petición de «separatas» que de todos los puntos del planeta caían sobre nuestro profesor Socías en demanda de datos que permitieran a los sabios extranjeros salir de sus propias dudas al respecto; cosa curiosa, ni siquiera faltaron algunas del otro lado del llamado «telón de acero».

Como premio a tan relevantes estudios, le fué concedido el premio «Alonso de Herrera» del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Fué uno de los fundadores de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, cuya presidencia le fué otorgada por elección hace todavía unos pocos meses; consejero de número del C. S. I. C., y miembro de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos. Asistió a numerosos congresos y reuniones internacionales de Microbiología como representante de España, y verificó viajes de estudio por Italia, Francia, Suiza, Dinamarca, etc., conservando con ello relaciones en los medios científicos, que irremediablemente repercutían en favor de los becarios y colaboradores que el Consejo podía enviar al extranjero.

Nos quiere salir del alma la protesta por haber perdido tan pronto a

este hombre capaz y bueno; pero ¿por qué lamentarnos si supo—gran sabio, en verdad—encauzar sus conocimientos filosóficos, teológicos y científicos para hallar sin duda el sendero eterno?

El amaba con especial delectación a esta revista, en la que tanta participación tuvo, y siempre se manifestaba exigente, porque la puntualidad estricta de su salida (que a él le hubiera encantado) casi siempre era estorbada por esos mil pequeños duentes que merodean por las redacciones y linotipias.

Por eso, al coincidir su marcha con uno de los números apareciendo dentro del horario señalado, estoy seguro de que—entre complacido y burlón—el profesor Socías nos habrá sonreído desde el Cielo...

J. DEL CAMPO LAWDAY.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICOLOGIA

«CROMOSOMAS LIGADOS» Y «MITOSIS ELEMENTALES» EN LOS NUCLEOS DE *ASPERGILLUS*

POR

A. Socías (†) y C. Ramírez Gómez (*)

INTRODUCCION

La estructura del núcleo de las plantas y de los animales ha sido objeto de numerosos trabajos en estos últimos años.

En ellos se han estudiado. no sólo diversos tipos de estructura nuclear, observando si variaban o se conservaban en los distintos tejidos, dentro de una misma especie, sino que también se ha intentado establecer si existen relaciones entre las estructuras nucleares y la posición sistemática de las especies, es decir, si es posible emplear los datos cariológicos en la taxonomía.

En cambio, en los hongos, los trabajos referentes a la estructura del núcleo son escasos y poco detallados. Seguramente ha contribuído a ello la pequeñez de dicha estructura y la dificultad de obtener imágenes fácilmente interpretables.

Para algunos autores, el núcleo se presenta en los hongos bajo el aspecto de una vacuola o cavidad nuclear, que contiene un corpúsculo central de apariencia homogénea, considerándolo como nucleolo cromatínico o *cariosoma.*

Rosen (1892) señala en el núcleo de los mixomicetos y de algunos hongos la presencia de gránulos cromatínicos, a los que Maire (1902) dió el nombre de *protocromosomas* y Stevens (1940) *procromosomas.*

Poirault y Raciborski (1895) vieron en el núcleo de los Uredinales una red cromatínica, y Fuhrmann (1905) encuentra en *Saccharomyces ellipsoideus* una red portadora de gránulos.

Bosc (1946), estudiando los núcleos de *Plasmopara viticola,* observa en el núcleo vegetativo una membrana, que conserva durante toda la duración de la división. En el estado intercinético presenta un *cariosoma* central o algo excéntrico, en cuyo interior se puede reconocer el cen-

(*) Trabajo póstumo del profesor A. Socías, entregado a nuestra revista en mayo del año actual.

triolo. Se distinguen también gránulos de cromatina periférica. Durante la división se observa la formación de husos.

Diversos autores han hecho estudios citológicos en varias especies de *Aspergillaceae*. Wakayama (1931) estudia la división nuclear vegetativa en trece especies de *Aspergillus*, siendo *Aspergillus niger* el mejor estudiado por él. Describe husos intranucleares con centrosomas polares y dos cromosomas como número haploide. Afirma el hecho de que los esterigmas son siempre uninucleados. Parece demostrar que el proceso de la mitosis está de acuerdo con los conocidos esquemas de las mitosis somáticas en los organismos superiores. Que los núcleos intercinéticos consisten en un cariosoma rodeado de un área clara y de una membrana nuclear. Observa. además, que como resultado de una sensibilidad peculiar de estos núcleos a la mayoría de los fijadores, la cromatina se agrupa alrededor del nucleolo, tiñéndose ambos como un solo corpúsculo. Condiciones semejantes han sido observadas por Olive (1944) en *Aspergillus fischeri*, y por P. Heim (1952) en diversas especies de ascomicetos. Pinto Lopes (1949), estudiando la estructura nuclear en varios hongos, especialmente basidiomicetos, señala la presencia de cromatina que engloba completamente al nucleolo, formando con él un corpúsculo intensamente coloreable Feulgen positivo, en el que no se puede discernir ninguna estructura interna. Walker (1935) encuentra en *Ascoidea rubescens*, ade-

FIG. 1.

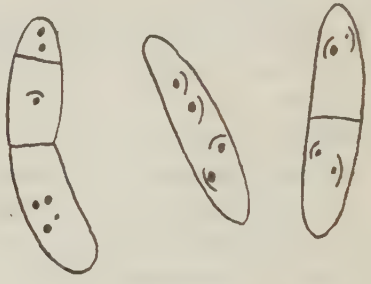


FIG. 2.

más de núcleos normales, otros de estructura extraña, especialmente hacia el ápice de las células jóvenes. Vistos de frente, parecen como núcleos intensamente teñidos, con un nucleolo muy grande (fig. 1). Vistos de perfil parecen como bacilos intensamente teñidos con un glóbulo igualmente teñido, unido lateralmente al centro del bacilo. Haciendo una

reconstrucción tridimensional de estos corpúsculos, es evidente que deben consistir en un disco circular y un glóbulo. Para este autor dichas estructuras serían núcleos degenerantes, ya que se presentan con más abundancia en los ápices de las hifas jóvenes que se desarrollan sobre hifas viejas largas, y son mucho menos abundantes en los ápices de las hifas jóvenes que no han formado todavía muchas células. Estas son, sin duda, las estructuras que Varitchak (1928, 1931) considera como núcleos meristemáticos o sexuales. A. Paillot (1943), estudiando una micosis de oruga de *Pieris brassicae,* encuentra en el micelio del hongo parásito unos núcleos, denominados por él «dobles núcleos», que se presentan con más frecuencia bajo forma de un bacilo arqueado, cubriendo un glóbulo esférico (fig. 2). Como se puede ver claramente, estos «dobles núcleos» deben corresponder a las estructuras de Walker y Varitchak.

La mayor parte de la literatura que trata de los núcleos de los *Aspergillus* se ocupa más bien del número de núcleos en los conidios, siendo el más extenso hasta ahora el de Yuill (1950), en el que hace el recuento nuclear en conidios de unas sesenta especies.

En cambio, pocos trabajos se han hecho sobre el movimiento de los núcleos, exceptuando a Baker (1945), Yuill (1950) y el más reciente de Ishitani y Sakaguchi (1955). donde observan el paso de los núcleos de las vesículas a los esterigmas y de éstos a los conidios.

De las descripciones de los distintos autores dedicados a la investigación de los núcleos en los hongos, se puede deducir que deben existir grandes variaciones en las estructuras nucleares, muchas diferencias en el comportamiento de los núcleos durante la división y que no existe área en este grupo de organismos sin problemas nucleares sin resolver.

INVESTIGACIONES PROPIAS

Material y métodos.

El material fresco ha sido fijado a título comparativo según diversos métodos. El fijador iodo-formol-acético, seguido por la tinción de Robinow (1942), nos ha proporcionado los mejores resultados.

Fijador iodo-formol-acético.

Solución acuosa de iodo y ioduro potásico al 1 %...	20	c. c.
Formol al 40 %	4	c. c.
Acido acético glacial	0,5	c. c.
Agua destilada	5-10	c. c.

Se mantienen las preparaciones durante doce-catorce horas en el fijador. Se lava en agua corriente abundante y se procede a la tinción.

Tinción de Giemsa (Robinow). (1942).

Después de fijado y lavado el material, se procede como sigue:

1. Se hidroliza durante diez minutos en ClH normal, a temperatura de 60° C.
2. Se lava con agua destilada tamponada a pH 7 hasta eliminar todo rastro de acidez.
3. Se procede a la tinción con colorante de Giemsa (una gota por centímetro cúbico de agua tamponada a pH 7) durante quince-cuarenta y cinco minutos.
4. Se pasan las preparaciones por las mezclas siguientes de acetona y xilol:

a)	20 de acetona y 1 de xilol	unos	segundos
b)	14 de acetona y 6 de xilol	»	»
c)	6 de acetona y 14 de xilol	»	»

5. Se dejan las preparaciones en xilol puro durante diez-quience minutos y se montan en bálsamo del Canadá neutro.

Preparación del agua tamponada a pH 7.

Se preparan las siguientes soluciones de fosfatos:

A. PO_4HNa_2 — 9,078 grs. en agua destilada hasta completar un litro.
B. PO_4H_2K — 11,876 grs. en agua destilada hasta completar un litro.

Se toman 61 c. c. de la solución A y 39 c. c. de la solución B, obteniéndose la solución tamponada a pH 7. Para poder conservar esta solución se echa un cristal de timol en ella.

Especies estudiadas.

Nuestras investigaciones sobre las estructuras nucleares han sido llevadas a cabo en dos especies de *Aspergillus* del grupo *glaucus,* productoras de peritecios: el *Aspergillus amstelodami* y el *Aspergillus ruber.*

Estas dos cepas han sido aisladas del aire en el laboratorio, conservándose en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid, con los números IJFM 395 y IJFM 397, respectivamente.

Descripción de las especies.

Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom y Church.—Sobre medio de Agar-Czapek con sacarosa al 3 por 100, produce colonias muy restringidas de unos 4 cms. de diámetro a los diez días de incubación a 25° C., planas o casi planas, de color amarillo, debido a los peritecios; reverso incoloro, pero que se vuelve ligeramente tostado con la edad.

Sobre medio de agar-Czapek con 20 por 100 de sacarosa, produce colonias más desarrolladas, de unos 10 cms. de diámetro a los diez días, más o menos surcadas y con zonas. donde alternan los peritecios con los conidióforos. Los peritecios son muy abundantes y se agrupan en masas que forman una espesa capa sobre la superficie del agar. de color amarillo vivo brillante; las cabezuelas son de color aceitunado oscuro, son más abundantes en el centro de las colonias, estando dispersas con irregularidad sobre el resto de la colonia. El reverso es de color amarillo bajo las áreas ocupadas por peritecios, y más o menos verdoso en las áreas donde predominan los conidióforos.

Los peritecios son más o menos esféricos, de 150 micras de diámetro por término medio, más o menos rodeados de hifas estériles; las ascas de 10-13 micras, contienen 8 ascosporas lenticulares, de 4,5-5 micras por 3,5-3,8 micras, con un canal ecuatorial de sección transversal en (V, Lámina III, núm. 78) y de superficie anchamente rugosa.

Las cabezuelas son más o menos esféricas (lám. III, núms. 75, 79, 80, 81), generalmente de 120 a 150 micras de diámetro, aunque las puede haber mayores; los conidióforos son incoloros o de color amarillo pálido, de 250 a 350 micras de largo por 10 a 12 micras de diámetro inmediatamente por debajo de la vesícula; la vesícula es más o menos esférica, de 12 a 25 micras de diámetro; los esterigmas miden de 5 a 6 micras, por término medio, pudiendo llegar a 8 (lám. III, núms. 72, 79, 81); los conidios (lám. 3, núms. 79, 77) son más o menos esféricos, finamente espinosos, variando entre 3,5 a 5 micras en el eje mayor.

Aspergillus ruber (Spiek y Bremer) Thom y Chuch.—Sobre medio de agar-Czapek con sacarosa al 3 por 100, produce colonias restringidas, de color pardo naranja a pardo rojizo; los peritecios son abundantes, lo mismo que las cabezuelas, de color verde aceituna; reverso de color rojo anaranjado a pardo.

Sobre medio de agar-Czapek con sacarosa al 20 por 100, las colonias se desarrollan rápidamente, con el borde irregular, planas, de color rojizo; los peritecios son muy abundantes, de color amarillo brillante, rodeados por hijas de color rojo; las cabezuelas, de color verde gris aceitunado, son también abundantes, sobre todo en el centro de las colonias. El reverso es de color rojo-pardo oscuro.

Los peritecios, más o menos esféricos, miden generalmente de 80 a 130 micras; las ascas de 12 a 15 micras; las ascosporas son lenticulares (lámina V, núm. 97), de 5 a 6 micras por 4,5 a 4,8 micras, con un canal ancho ecuatorial, de pared lisa, excepto una finísima rugosidad en el borde del canal ecuatorial.

Las cabezuelas, de color de aceituna, son esféricas, de 150 a 250 micras de diámetro; los conidióforos son lisos, incoloros o de color pardo anaranjado, de 500 a 700 micras de longitud, con una anchura de 14 a 16 micras en las inmediaciones de la vesícula (lám. V, núm. 95); vesícula de forma más o menos esférica, de 25 a 35 micras de diámetro; esterigmas en una sola serie, midiendo generalmente de 7 a 9 micras por 4 a 5 micras; los conidios (lám. V, 95) son elípticos a subesféricos, de superficie espinosa, llegando a medir de 6 a 12 micras en el eje mayor.

Estudio cariológico.

Aspecto en el micelio en general.

Los núcleos en los micelios (lám. IV, núm. 92) pueden presentar dos aspectos extremos:

Unos son uniformes y homogéneos al ser teñidos, no pudiéndose observar en ellos ninguna estructura interna. Lo mismo ocurre en el conidióforo (lám. III, núms. 75, 76, 80, 81), en los esterigmas (lám. III, números 74, 75, 81), (lám. V, n.m. 98), en los conidios, tanto en reposo (lámina IV, núm. 82), (lám. V, núm. 101), como en germinación (lám. IV, número 88), (lám. V, núms. 99, 100). A pesar de no poderse observar en ellos figuras mitóticas, no parecen estar en estado intercinético, pues observamos en ellos movimientos y divisiones que nos hacen pensar que están en plena actividad mitótica. En la lámina III, núm. 76, se puede observar en el conidióforo cómo los núcleos están orientados hacia la vesícula, pareciendo dirigirse a ella como empujados o arrastrados por una corriente. Al mismo tiempo se alargan y siguen dividiéndose, sin aparentes figuras mitóticas, exceptuando algunos casos, como puede verse en dos núcleos del mencionado conidióforo, en los que se forman dos masas cromatínicas polares. En la lámina III, núm. 75, se ven varios núcleos en el momento de pasar de la vesícula a los esterigmas. En los conidios en germinación también se pueden observar estas divisiones, *aparentemente amistósicas* (lám. IV, núm. 85). Igualmente se producen dichas divisiones en los conidios maduros, no germinados (lám. III, núm. 81).

Otros núcleos vegetativos tienen un aspecto, *en apariencia,* totalmente opuesto al descrito anteriormente. En lugar de presentarse en forma homogénea, sin poderse discernir en ellos estructura interna alguna, presentan, en cambio, estructuras discernibles, parecidas a figuras mitóticas. Se observan estos núcleos en las hifas. sobre todo jóvenes; por tanto, en pleno crecimiento (lám. IV, núm. 94), como en los conidios no maduros (lám. V, núm. 102), en los conidios maduros (lám. III, núms. 74 y 77) y en los conidios en germinación (lám. IV, núms. 84, 89 y 90).

Aspecto en los conidióforos de «Aspergillus amstelodami».

Siguiendo el desarrollo en *Aspergillus amstelodami,* se pueden ver sincitios de las hifas que se diferencian para dar lugar a las células del pie. Estas son mayores que las células adyacentes, produciendo un conidióforo generalmente por gemación y alargamiento ulterior.

En las hifas en vías de crecimiento se observan los núcleos en intensa división. A medida que las hifas crecen rápidamente, las partes más distales son cortadas transversalmente por tabiques. Los compartimientos entre estos tabiques varían grandemente de longitud y su contenido varía en el número de núcleos. No existe una disposición constante en la colocación de los núcleos, excepto que en los ápices de crecimiento intenso hay mayor número de ellos. El conidióforo originado por la célula del pie es no tabicado. Es difícil saber si sus numerosos núcleos proceden de uno solo o de varios, porque están en constante división a medida que pasan de la célula del pie a él. El conidióforo, en su parte distal, se ensancha hacia el ápice y abunda en núcleos en activa división (lámina III, núm. 76).

En la madurez se produce una dilatación apical (la vesícula). Esta es globosa o hemisférica. A ella se encaminan los núcleos del conidióforo, sin dejar de dividirse. Pronto se forman en la superficie numerosas protuberancias. que darán lugar a los esterigmas (lám. III, núm. 80). En el momento de formarse los esterigmas no se observa ninguna migración nuclear hacia ellos. Cuando éstos alcanzan la madurez y tamaño definitivo (lám. III, núm. 75), un núcleo pasa de la vesícula al esterigma, donde se divide (lám. III, núm. 81), para suministrar los núcleos a los conidios en formación.

En principio, los esterigmas de esta especie parecen ser uninucleados, pero a causa de su pronta división se encuentran con dos núcleos y a veces con tres (lám. III, núm. 81). Uno de los núcleos del esterigma pasa por el estrechamiento productor de conidios o fiálide hacia un hinchamiento que se produce en su ápice que se convertirá en conidio. En el momento en que los esterigmas van a producir los conidios, se observan entonces divisiones parecidas a mitosis, que Wakayama (1931) observa también en las especies estudiadas por él. El fiálide continúa produciendo conidios, acrógenamente, quedando separados entre sí por ta-

biques y formando largas ristras. Cada conidio lleva un núcleo derivado directamente de las divisiones sucesivas del núcleo del esterigma.

En cada conidio se produce posteriormente una división nuclear, por lo que éstos son binucleados en la madurez. En la lámina III, núm. 77, vemos dos figuras parecidas a metafases mitóticas en dos conidios maduros.

Aspecto en los conidióforos del «Aspergillus ruber».

En *Aspergillus ruber,* el desarrollo del conidióforo es idéntico al descrito para *Aspergillus amstelodami,* pero en esta especie los esterigmas son plurinucleados. Se pueden ver uno o más núcleos pasando de la vesícula al esterigma. Igualmente se ven grupos de núcleos en movimiento hacia el conidio en formación (lám. V, núm. 98).

Los conidios pueden aumentar el número de sus núcleos durante la maduración, por divisiones nucleares independientes, llegando a menudo a tener más de diez núcleos por conidio.

Aspectos intermediarios.

Además de los aspectos ya descritos anteriormente, unos homogéneos y uniformes, sin estructuras internas discernibles, y otros con estructuras claramente discernibles, hemos encontrado núcleos cuyo aspecto es intermedio entre estos dos casos extremos.

En ellos se distinguen finas estructuras, pudiéndose apreciar una membrana nuclear, un nucleoplasma ligeramente teñido de rosa por la reacción de Feulgen, en el cual se encuentran dispersos un cierto número de gránulos cromatínicos, intensamente teñidos de rojo y unidos entre sí por finísimos filamentos teñidos de rosa. Creemos que estos gránulos se corresponden con cromosomas, por su comportamiento característico en la división nuclear y por su número, que coincide generalmente con el de «cromosomas».

Aspecto en las estructuras sexuales.

El orden de los *Plectascales,* al que pertenecen estos hongos, se considera generalmente como el grupo más primitivo de los *Euascomicetos.* Estos se distinguen de los *Hemiascomicetos* por la producción de estruc-

turas sexuales bien definidas con la formación de hifas ascógenas, en las que los núcleos están típicamente emparejados.

En la mayoría de los casos, las hifas ascógenas dan nacimiento a las ascas por medio de arrollamientos típicos de las hifas, acompañados por divisiones nucleares conjugadas. Parece probable que este proceso de arrollamiento sea el principal en la formación de las ascas.

De Lamater (1937) describe arrollamiento de hifas en una variedad de *Arachniotus aureus* (Gimnoascáceo). Este es probablemente el miembro más primitivo de los ascomicetos en el que se hayan visto los arrollamientos. El peritecio de este hongo homotálico se inicia por un anteridio y ascogonio uninucleado, en la misma o en distinta hifa. El ascogonio se arrolla alrededor del anteridio, mientras se producen divisiones mitóticas en ambos, fusionándose ambos órganos en el ápice. Se producen emparejamientos nucleares en el ascogonio y se producen hifas ascógenas que dan lugar a las ascas de forma típica, con las tres divisiones nucleares después de la cariogamia.

Nosotros hemos podido observar fenómenos parecidos a los descritos arriba en *Aspergillus amstelodami*. En la lámina III, núm. 73 se pueden ver dos hifas sexuales, probablemente anteridio y ascogonio, de diámetro menor al de las hifas somáticas, plurinucleadas, en el momento de arrollarse para dar origen más tarde a las hifas ascógenas, productoras de ascas. En ellas se observan ya los emparejamientos de los núcleos, sobre todo en la parte apical.

Aspecto de los núcleos en las ascosporas.

Examinando núcleos de las ascosporas, hemos observado en muchos casos la presencia de un gránulo cromatínico más o menos grueso y esférico, muchas veces unido a otro cuerpo cromatínico que tiene forma de media luna, por un filamento fino (lám. II, núm. 62); otras veces estrechamente aplicado (lám. II, núm. 61), (lám. VI, núm. 118), y otras unidos por varios filamentos finísimos (lám. VI, núms. 119, 120, 121), o bien suelto dentro del área nuclear, sin ninguna relación con el cuerpo en media luna (lám. VI, núms. 136, 138. 139, 149, 150).

Estas estructuras pueden recordar muy bien las observadas por Walker (1935) en *Ascoidea rubescens* (fig. 1), pensando dicho autor que po-

drían ser núcleos en degeneración, por proceder en su mayoría de hifas jóvenes, nacidas sobre viejas. También tienen cierta analogía con los llamados «núcleos meristemáticos» o «sexuales» de Varitchak (1928-1931) y con los «dobles núcleos» de Paillot (1943) (fig. 2).

Nosotros no creemos, en este caso, que sean núcleos degenerados, pues los encontramos en su mayoría en las ascosporas en germinación, tanto de *Aspergillus amstelodami* como de *Aspergillus ruber*. En la lámina VI, número 152, pueden verse cinco gránulos pequeños, dispuestos en media luna, unidos entre sí por un fino filamento a otro gránulo mayor.

Haciendo una tinción con *verde luz*, aparece entonces el nucleolo teñido de verde, en la posición del gránulo, enmascarado en parte por materia Feulgen positiva, unida al resto de la cromatina por un filamento (lámina VI, núms. 115, 117, 136, 137, 138, 142, 143, 146, 147, 149, 150). Haciendo tinciones, sin hidrólisis previa, con *verde luz* parece confirmarse nuestra idea de que el nucleolo estaba enmascarado por el gránulo cromatínico adyacente a él. Como éstos permanecen entonces incoloros, aparece claramente el nucleolo teñido de verde.

Pinto Lopes (1949) encuentra también en los basidiomicetos una masa cromatínica que engloba por completo al nucleolo, formando con él un cuerpo intensamente Feulgen positivo, en el que no se puede discernir estructura alguna.

P. Heim (1952) encuentra en los ascomicetos examinados por ella una estructura parecida a ésta.

Aspecto en la germinación de los conidios.

La germinación empieza a producirse a partir de las ocho horas de incubación a 25° C. Durante este proceso el aumento de tamaño de los conidios es manifiesto; con frecuencia llegan a duplicar de volumen. En *Aspergillus amstelodami* son binucleados (lám. IV, núm. 82), y en *Aspergillus ruber* son plurinucleados y pasan de diez (lám. V, núm. 101). En la primera especie los dos núcleos se dirigen hacia el tubo de germinación, mientras empiezan a dividirse (lám. IV, núm. 83). A medida que se alarga el tubo se pueden observar los núcleos en intensa división, multiplicándose extraordinariamente su número (lám. IV, núms. 84 y 85), adoptando toda clase de formas extrañas, alargándose mucho, espirali-

zándose (lám. IV, núm. 89), tomando forma de Y o de V (lám. IV, números 84, 90, 91). Se pueden formar uno o dos tubos de germinación (lámina IV, núms. 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94). Después de alargarse más o menos, aparece el primer tabique que separa el conidio del tubo. Entonces los conidios tienen más de dos núcleos generalmente. Cuando el micelio se va alargando, se van formando nuevos tabiques, que separan sincitios con variable número de núcleos en cada compartimiento. Se pueden encontrar también hifas con compartimientos uninucleados (lámina IV, núm. 93). No hay una disposición constante en la colocación de los núcleos, exceptuando los ápices de las hifas de crecimiento intenso en longitud, donde existen en mayor número.

Aspecto en la germinación de las ascosporas.

Lo mismo que los conidios, las ascosporas aumentan mucho de tamaño en el momento de la germinación. El núcleo en reposo en la ascospora, de *Aspergillus amstelodami,* que es uninucleada, es muy pequeño (lámina I, núm. 1), midiendo unas 0.3 micras de diámetro. Al entrar en actividad, su volumen aumenta relativamente, llegando a medir 1 a 1,2 micras, o sea tres a cuatro veces más que en estado de reposo. De las observaciones hechas en la germinación de las ascosporas se puede sacar la conclusión de que la división del núcleo puede preceder, acompañar o seguir la emergencia del tubo germinativo. Ejemplo de ello tenemos en las lámínas I, núms. 3, 4, 5, 6, donde la división del núcleo precede a la emergencia del tubo germinativo; en la lámina II, núms. 56, 57, 63, 64, 65, 67, 68, donde la división acompaña y sigue a la emergencia del tubo de germinación.

El núcleo de la ascospora posee una membrana nuclear y un nucleolo esférico, que ocupa generalmente una posición excéntrica, y, como hemos dicho más arriba, se colorea con el verde luz. Sumergidos en el nucleoplasma se encuentran unos gránulos intensamente coloreados por la reacción nuclear, generalmente en número aproximado al de cromosomas. En la mayoría de los casos en que observamos divisiones nucleares en las ascosporas, vemos que la cromatina, en lugar de rellenar todo el espacio nuclear, ocupa uno de los polos del núcleo. En muchos casos deja de verse el contorno del núcleo, quedando sólo visible la cromatina.

que adopta formas variables, unas veces de filamentos arqueados, más o menos sinuosos (lám. I, núm. 48), (lám. II, núms. 49, 50), otras veces toma apariencia de rosario de granulaciones (lám. II, núm. 51), (lám. VI, número 152), que podrían interpretarse como cromosomas. En dicha figura uno de los núcleos arrosariados parece haberse dividido en dos, con dos series paralelas de aproximadamente seis «cromosomas» en cada una. Otro núcleo parece estar dividiéndose también, pero en este caso el rosario de «cromosomas» parece formar una sola fila con diez gránulos pequeños, situados entre dos glóbulos, que podían ser dos nucleolos, enmascarados por materia cromatínica. También observamos núcleos tan intensamente teñidos por la reacción de Feulgen, que parecen homogéneos, no pudiéndose discernir ninguna estructura en ellos, como ocurre en los núcleos vegetativos (lám. II, núms. 52, 67), (lám. VI, núms. 109, 112, 113), lo mismo que en los conidios en germinación. Al mismo tiempo observamos todas las fases intermedias entre los núcleos homogéneos y aquellos en los que no se ve el contorno nuclear (lám. II, núm. 68), (lámina VI, núms. 109, 127 a 139), e incluso en una misma ascospora se pueden encontrar los núcleos en estos distintos estados (lám. I, núm. 43), (lám. II, núms. 61, 69).

En *Aspergillus ruber* el núcleo en reposo de las ascosporas mide unas 0,6 micras y se divide varias veces antes de formarse el tubo de germinación, llegando a tener hasta ocho núcleos, que pueden medir una micra de diámetro cada uno.

En ambas especies el comportamiento de los núcleos es bastante parecido con diferencias de detalle.

En la lámina II, núms. 49 y 50, vemos la aparición del primer tabique que separa la ascospora del tubo de germinación; éste seguirá alargándose con una intensa multiplicación nuclear. A medida que el tubo de germinación se alarga se van formando nuevos tabiques, dando lugar a sincitios con número variable de núcleos en cada uno de ellos, y se originan ramificaciones que darán origen al micelio. Las ascosporas se vuelven plurinucleadas (lám. II, núms. 71 y 70). En ellas, como en las células de micelio, la mayoría de los núcleos están densamente teñidos, no pudiéndose observar estructura alguna en ellos.

Interpretación cariológica.

Las propiedades clásicas adscritas a los cromosomas son: la *individualidad,* la *diferenciación* a lo largo de su eje mayor, su presencia en *número constante,* un ciclo de *espiralización* y *relajación* durante la división nuclear y, finalmente, su *duplicación,* que invariablemente se ha encontrado se realiza longitudinalmente. Así, las estructuras que se dividen transversalmente no pueden ser consideradas como cromosomas. A estas propiedades morfológicas hay que añadir el hecho de que los cromosomas contienen casi invariablemente compuestos del ácido desoxiribonucleico. Esta asociación es tan corriente, que la presencia en ellos de dicho ácido puede ser considerada en la actualidad como característica preeminente de los núcleos. Todas estas propiedades parecen poderse aplicar a los bastoncitos y también a los gránulos encontrados en los núcleos de las dos especies de *Aspergillus* estudiadas por nosotros, con la particularidad de que unas veces estos «cromosomas» están individualizados y otras ligados unos con otros a modo de ristras de perlas.

Nos inclinamos a interpretar que la variabilidad observada en la estructura de los núcleos podría ser debida al grado de descromatización del núcleo, que quedaría más o menos impregnado, según los casos, en sustancia Feulgen positiva, pareciendo no depender este grado de impregnación de las fases de división del núcleo.

Aunque hemos observado agrupaciones de aproximadamente seis «cromosomas» (lám. IV, núm. 94), también observamos parejas de filamentos (lám. I, núms. 6, 22, 23, 32, 33, 34, 35, 41, 42), (lám. II, núm. 49) dispuestas paralelamente; igualmente se ven filamentos en el momento de dividirse longitudinalmente en dos, adoptando forma de V o de Y (lámina I, núms. 5, 11, 14, 15, 16, 18, 21, 27, 28, 30, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44), (lám. II, núms. 49, 69), (lám. VI, núm. 114). Sugerimos que puedan ser núcleos donde los «cromosomas», no estando visiblemente individualizados, estarían alineados y ligados, como se ven en la lámina II, número 51 (lám. VI, núm. 152), donde se verían dos filas paralelas de «cromatidas» homólogas ligadas a punto de separarse del todo

Grell (1953) introduce, en un intento para explicar el extraño comportamiento de los cromosomas en ciertas formas de división nuclear encontradas en los protozoos, un nuevo concepto, el de la «segregación ge-

nómica». En ellos los cromosomas, generalmente muy numerosos, parecen completamente divididos en la profase. No se forma huso, y las cromátidas son segregadas en dos porciones por constricción gradual del núcleo.

El aspecto más extraño de este modo de división (esencialmente endomitótica, seguida de división nuclear inmediata) es el hecho de que cromátidas hermanas se mueven hacia el mismo polo.

El autor opina que esto parece indicar, por deducción lógica, que todos los cromosomas han de ser iguales.

El mismo autor dice que en ciertas fases de división en el radiolario *Aulachantha scholymantha,* los cromosomas de este organismo, estimados en más de mil, son filamentos largos y lisos, pero otras veces aparecen como cadenas de segmentos de diferente longitud y forma. La sucesión de los segmentos es la misma en distintos «cromosomas», y Grell sugiere que los segmentos son los cromosomas, y que cada cadena representa un grupo de ellos. En lugar de tener más de mil «cromosomas» diferentes, *Aulachantha* tendría otros tantos grupos, iguales entre sí, de cromosomas diferentes ligados en una unidad. Estas unidades serían iguales entre sí.

Podríamos, pues, por deducción teórica, admitir que en estos hongos los «cromosomas» pueden estar unas veces visiblemente individualizados, y otras, al menos en el momento de la división nuclear, se reunirían para formar a modo de un «*cromosoma múltiple*» o «*cromosomas ligados*», o «*genoma de cromosomas ligados*». Esto permitiría que los núcleos hijos siempre tuviesen todos los «cromosomas» y sólo difiriesen en el número de veces que estuviesen repetidos los «cromosomas ligados», o se en el múltiplo del genoma. Deducción teórica que en más de un caso hemos creído ver confirmada por la observación microscópica.

Número de «cromosomas».

Hemos podido contar aproximadamente unos seis gránulos en *Aspergillus amstelodami,* que corresponden aproximadamente al número de «cromosomas», como puede apreciarse en la lámina IV, núm. 94, en un conidio en gemmación, donde se ven grupos de seis «cromosomas» bacilares.

En *Aspergillus ruber* contamos aproximadamente seis (lám. VI, número 152).

Estos gránulos podrían ser porciones de «cromosomas» que no han sufrido grandes modificaciones en la telofase anterior y se han conservado intactos. Podrían corresponder a cromocentros.

La cromatina no llena completamente la vesícula nuclear, sino que se encuentra dispuesta en la periferia, en forma de media luna, ofreciendo así cierta polaridad (lám. IV, núms. 84, 87), (lám. III, núm. 76). Del lado opuesto se encuentra un corpúsculo (nucleolo) redondeado, que se tiñe de rojo por la reacción nuclear.

Aplicando estas ideas a nuestras observaciones en los *Aspergillus,* los filamentos serían grupos de seis cromosomas diferentes, ligados entre sí (lám. II, núm. 51), (lám. VI, núm. 152), formando una unidad, y todas ellas iguales. A estas unidades las hemos llamado «cromosomas ligados» o «genomas de cromosomas ligados».

Formación de husos.

Algunas figuras (lám. I, núms. 3, 4), (lám. VI, núm. 125) nos hacen pensar en la presencia de husos. La lámina I, núm. 3, podría representar una placa ecuatorial. La lámina I, núm. 4, podría ser un momento de la anafase en que los «cromosomas» invisibles, dispuestos en línea, se habrían trasladado a sus respectivos polos. En la lámina VI, núm. 125, se observa también una especie de huso, con masas cromatínicas en cada polo. Se observan de cuando en cuando fases de espiralización de la cromatina (lámina I, núm. 46), (lám. II, núm. 50), (lám. VI, núms. 122, 123, 124, 125, 140, 141).

Mitosis elemental.

Para seguir nuestra interpretación necesitamos establecer un concepto claro de amitosis. Robinow dice recientemente (1956) de ella: «Consiste en la división directa del núcleo sin producción de cromosomas ni de huso. Es el modo normal de división del macronúcleo de los protozoos ciliados. Este modo de división no se reduce a tales protozoos. Los anti-

guos micólogos afirmaban que los núcleos vegetativos de ciertos hongos se dividían así». Esta creencia, aunque menos admitida actualmente, sin embargo, han conseguido ponerla de nuevo en evidencia este autor y sus colaboradores en la segregación de los cromosomas en especies de *Saprolegnia, Mucor, Phycomyces* y *Geotrichum,* en los que consideran que la división de los núcleos es directa sin formación de husos ni placas metafásicas (datos no publicados). Sin embargo, existen tantas cosas extrañas e insospechadas en la estructura de los núcleos de estos hongos que es probable que estas materias permanezcan todavía mucho tiempo en el campo de la controversia.

Por lo expuesto en este trabajo sospechamos que, al menos en los hongos aquí estudiados, las amitosis no son tales, sino que se trata de «mitosis elementales». Estas mitosis no las observarían la mayoría de los autores, debido a que, según hemos dicho, quedan enmascaradas por la cromatina, y sólo se ve a modo de una división directa; de aquí que las consideren como tales o amitosis. ¿Puede este concepto generalizarse a todas las amitosis? No podemos contestar, y tan sólo formulamos la pregunta.

Por «mitosis elemental» entendemos aquella en que todas las fases de la mitosis clásica estarían reducidas a la duplicación o formación de las dos cromatidas o cromosomas hijos de un «genoma de cromosomas ligados». En ella a veces aparecerían esbozos de husos.

Esta «mitosis elemental» permitiría la distribución equitativa cualitativa de «cromosomas», y la única diferencia de los núcleos hijos estribaría en la distribución cuantitativa de los «genomas ligados» que cada uno recibiría.

CONCLUSIONES

De nuestras observaciones sobre el núcleo de conidios y ascosporas en germinación de *Aspergillus amstelodami* y *Aspergillus ruber,* resultan los siguientes hechos:

a) La cromatina nuclear se presenta bajo forma de gránulos de tamaños diversos, unidos por finos filamentos. Estos parece que tienen las propiedades adscritas a los cromosomas, como son: la *individualidad,* la *diferenciación* a lo largo de su eje mayor, su presencia en *número constante,* un ciclo de *espiralización* y *relajación* durante la división nuclear, y, finalmente, su *duplicación.*

b) La variabilidad en la coloración de los núcleos—desde los que están homogénea, densa y plenamente teñidos, donde no se disciernen estructuras internas, a los que por estarlo menos densa y además heterogéneamente, dejan discernir perfectamente las estructuras internas, pasando por los grados intermedios—residiría en el grado de descromatinización de los núcleos, el cual sería independiente de las fases de división nucleares. Debido a ello, muchas divisiones en los núcleos densamente teñidos podrían parecer amitósicas, por quedar enmascaradas las fases de división por la sustancia Feulgen positiva que impregna los núcleos, volviéndolos opacos a la observación. Pero al mismo tiempo y en los mismos sincitios se observan divisiones nucleares que parecen esquemáticamente mitóticas, no siendo lógico pensar que unos núcleos se dividirían por amitosis y otros por mitosis, por lo que creemos que podrían ser todas divisiones «*mitóticas elementales*».

c) En los núcleos pequeños del micelio la vesícula nuclear no permitiría mucho el alargamiento de los cromosomas, como ocurre en los de mayores dimensiones. Así parecen observarse en los núcleos pequeños con más frecuencia, bajo la forma de gránulos. Su número parece corresponder generalmente al de los «cromosomas».

d) El número de cromosomas en *Aspergillus amstelodami* y *Aspergillus ruber* parece ser de seis.

e) El nucleolo es visible durante las divisiones; es de forma globosa y muchas veces está enmascarado por cromatina.

f) Encontramos con mucha frecuencia en los núcleos de ascosporas y conidios en germinación parejas de filamentos paralelas entre sí o formando V o Y, en trance de separarse por división longitudinal.

g) Estos filamentos están formando ristras de gránulos, cuyo número corresponde al de cromosomas, y sugerimos la idea—que no excluye el que las divisiones puedan ser mitóticas—de que estos filamentos lleven los «cromosomas» que están ligados entre sí como los eslabones de una cadena. Cada filamento sería, pues, un *cromosoma múltiple* compuesto de «cromosomas ligados» o «genoma de cromosoma ligados» capaz de «*mitosis elementales*».

h) Las divisiones nucleares durante la germinación se suceden a un ritmo muy rápido, no siendo generalmente simultáneas las fases en los distintos núcleos de un sincitio.

RÉSUMÉ

Il résulte de nos observations sur le noyau d'*Aspergillus amstelodami* et d'*Aspergillus ruber*, les faits suivants:

La chromatine se présente sous forme de granules de diverses tailles, qui semblent correspondre à des chromocentres.

La variabilité dans la coloration des noyaux, depuis ceux qui se colorent d'une façon homogène, dense et complète, où l'on ne peut distinguer la structure ínterne, à ceux dont la coloration est moins dense et plutôt hétérogène, aù l'on peut discerner parfaitement la structure interne, en passant par tous les degrés intermédiaires, résiderait dans la degré de dechromatinisation des noyaux. Ce degré serait indépendant des stades de division des noyaux. Ces divisions pourrait être «mitotiques élémentaires».

Dans les petits noyaux du mycélium, la vésicule nucléaire ne permettrait pas aux «chromosomes» de se détendre comme le cas se présente dans les noyaux de taille plus élevée. Ils se conservent dans ceux-là presque toujours son forme de granules. Leur nombre correspond, en général, à celui des «chromosomes».

Aspergillus amstelodami et *Aspergillus ruber* ont à peut près six «chromosomes».

Le nucléole est visibles pendant les divisions nucléaires. Il est souvent masqué par un granule de chromatine.

On observe souvent dans les noyaux des ascospores et des conidies en train de germer, des filaments groupés par paires ou en forme de V ou d'Y, qui se divisent longitudinalement.

Ces filaments sont formés de granules en chapelet, dont le nombre correspond à celui des «chromosomes». Les auteurs pensent, —idée compatible avec la division mitotique— que ces filaments sont porteurs des «chromosomes» unis ou liés entre eux comme les chaînons dans une chaîne. Chaque filament serait donc un «chromosome multiple» ou «génome de chromosomes liés» capable d'une mitose élémentaire».

Les divisions nucléaires se succèdent à un rhythme très rapide pendant la germination des ascospores et des conidies. Les stades ne sont généralement pas simultanés dans les nombreux noyaux d'une cellule.

SUMMARY

In this paper the authors resume the studies on the conidious and ascospores nucleus in germination. They realize analogous studies on the nucleus of *Aspergillus amstelodami* and *Aspergillus ruber,* and describe the technics employed in this manner as the results obtained.

BIBLIOGRAFIA

Baker Cladys, E. Conidium formation in species of Aspergilli. Mycologia. 37; 582-600, 1945.

Bosc, M. Sur la structure des noyaux et la meiose de Plasmopara Viticola. Compt. Rend. Acad. Sci. París, 223; 584-586, 1946.

De Lamater, E. D. Crozier formation in the Gymnoascaceae: A preliminary note. Mycologia, 29: 187-198, 1937.

Fuhrmann, M. Die erntheilung von Saccharomyces ellipsoideus. Centr. f. Bakt. Abt., II, 15, 1905.

Grell, K. G. Die Chromosomen Von Aulacantha scolymantha. Arch. Protistenk. 99, 1-54, 1953.

Heim, *Panca.* Observations sur le noyau des Ascomycètes. Rev. de Mycologie, 17: 1-38, 1952.

Ishitani, Chiyoko and Kin-Ichiro Sakaguchi. J. Gen. App. Micr. vol. 1, n.º 4: 287-297, 1955.

Maire, R. Recherches cytologiques et taxonomiques sur les Basidiomycètes. Bull. Soc. Myc. Fran. 8: 1902.

Olive, L. S. Developpment of the perithecium in Aspergillus fischeri Wehmer, with a description of crozier formation. Mycologia, 36; 266-275, 1944.

Paillot, Andrés. Sur une nouvelle mycose de la chenille de Pieris brassicae. Compt. Rend. Acad. Sci. (París), 217; 383-384, 1943.

Pinto Lopes, J. Contribution to the study of the nuclear structure in Fungi. Port. Acta. Biol., sér. A, 2; 191-210, 1949.

Poirault, G., et Baciborsky, M. Sur les noyaux des Urédinées. J. de Bot., 9, 1895.

Robinow, C. F. A study of the nuclear apparatus of bacteria. Roy Soc. London. Proc. B., 130; 299-324, 1942.

The chromatin body of bacteria. Bact. Rew., 20; 200-237, 1956.

Rosen. M. Beitrage zur Kenntnis der Kerne und Membranbildung bei Myxomyceten und Pilzen. Beitra. z. Biologie d. Pflanzen, 1892.

Stevens, R. B. Certain nuclear phenomena in Albugo portulacae. Mycologia, 32; 1940.

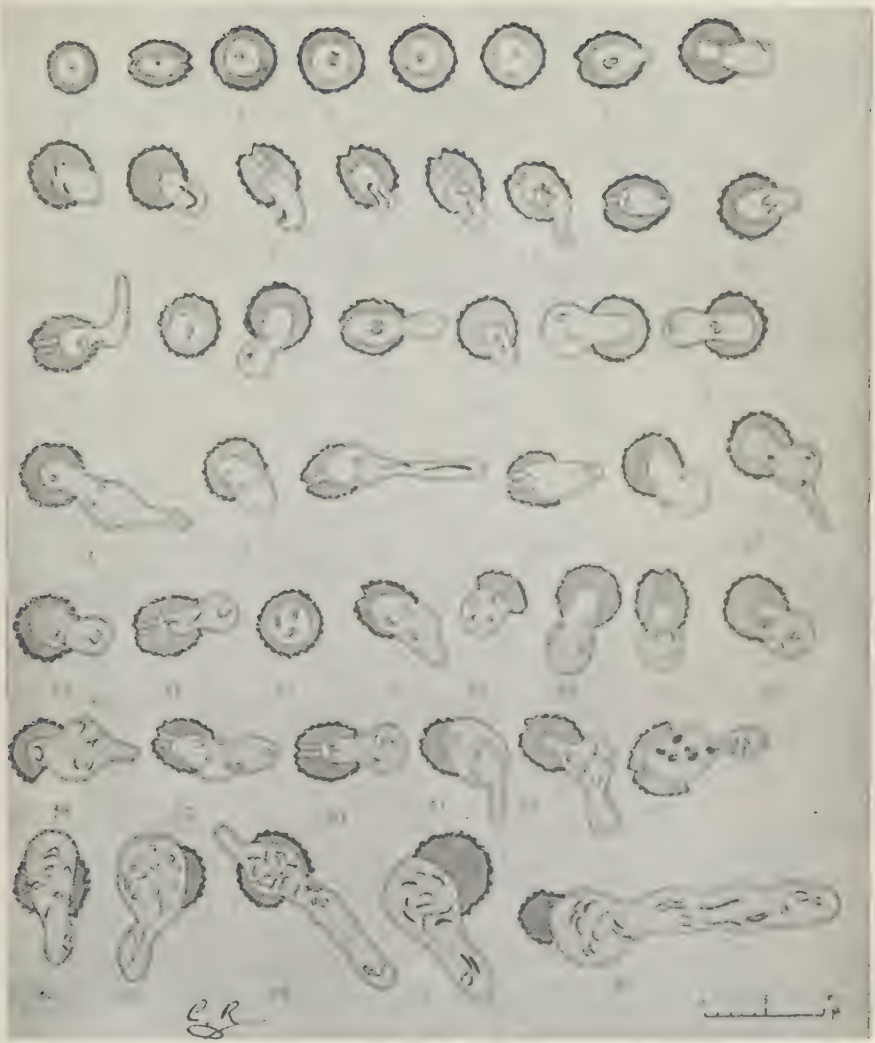
Varitchak, B. L'évolution nucléaire chez Ascoidea rubescens. Compt. Rend. Acad. Sci. (París), 186; 96-98, 1928.

Contribution à l'étude du développement des Ascomycètes. Le Botaniste, 23; 1-183, 1931.

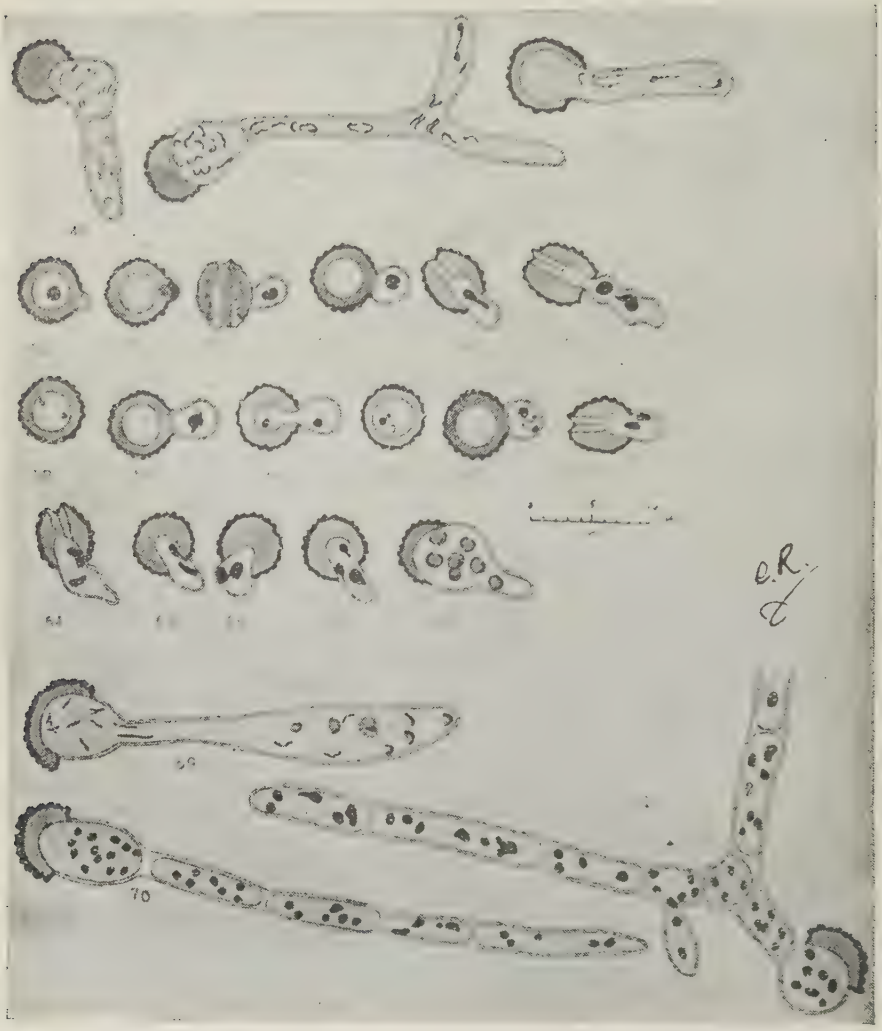
WAKAYAMA, K. Contribution to the cytology of Fungi. III. Chromosome number in Aspergillus. Cytologia, 2; 291-301, 1931.

WALKER, LEVA B. Studies on Ascoidea rubescens. II. Cytological observations. Mycologia, 27; 102-127, 1935.

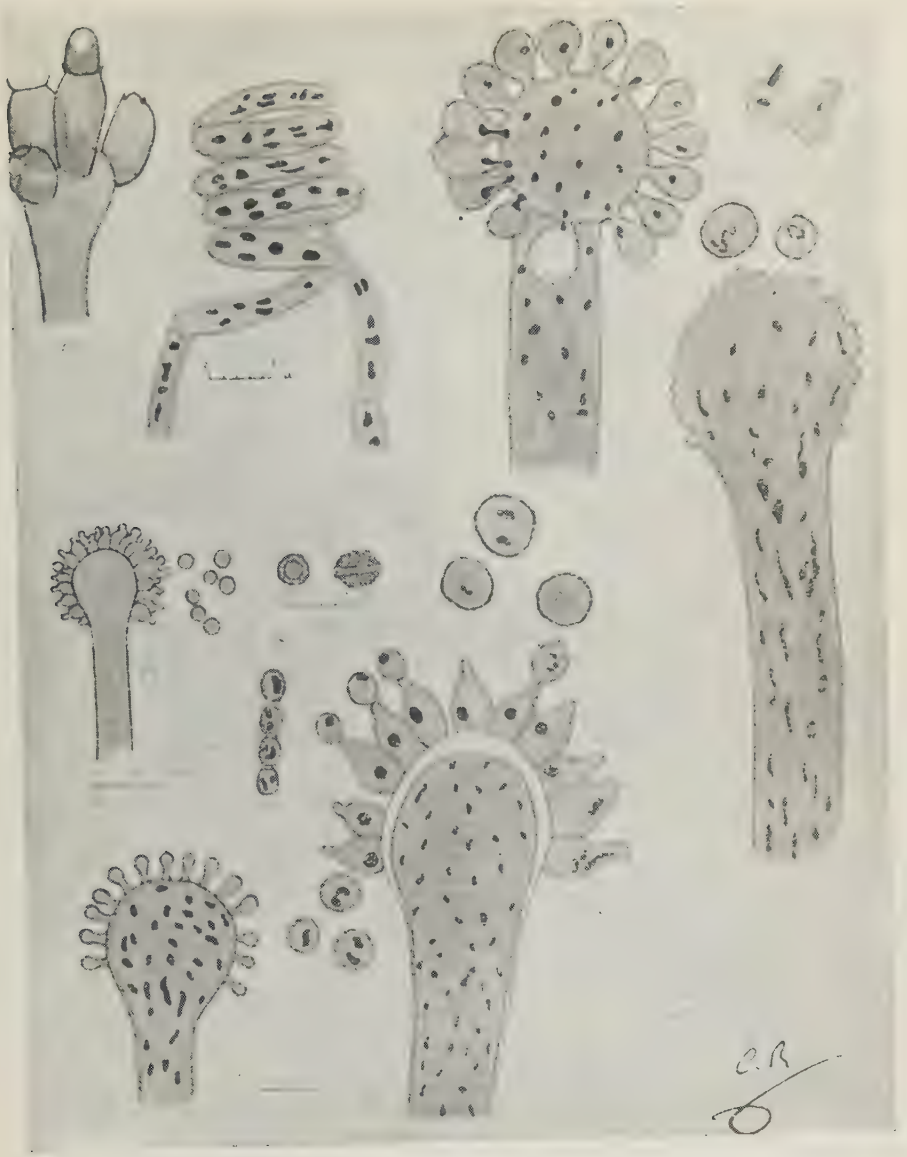
YUILL, E. Trans. Brit. Mycol. Soc., 33; 324.



Aspergillus amstelodami IJFM 395. Ascosporas en germinación a las veinticuatro horas, a 25° C., teñidas según la técnica de Robinow. (Dibujadas con cámara clara.)

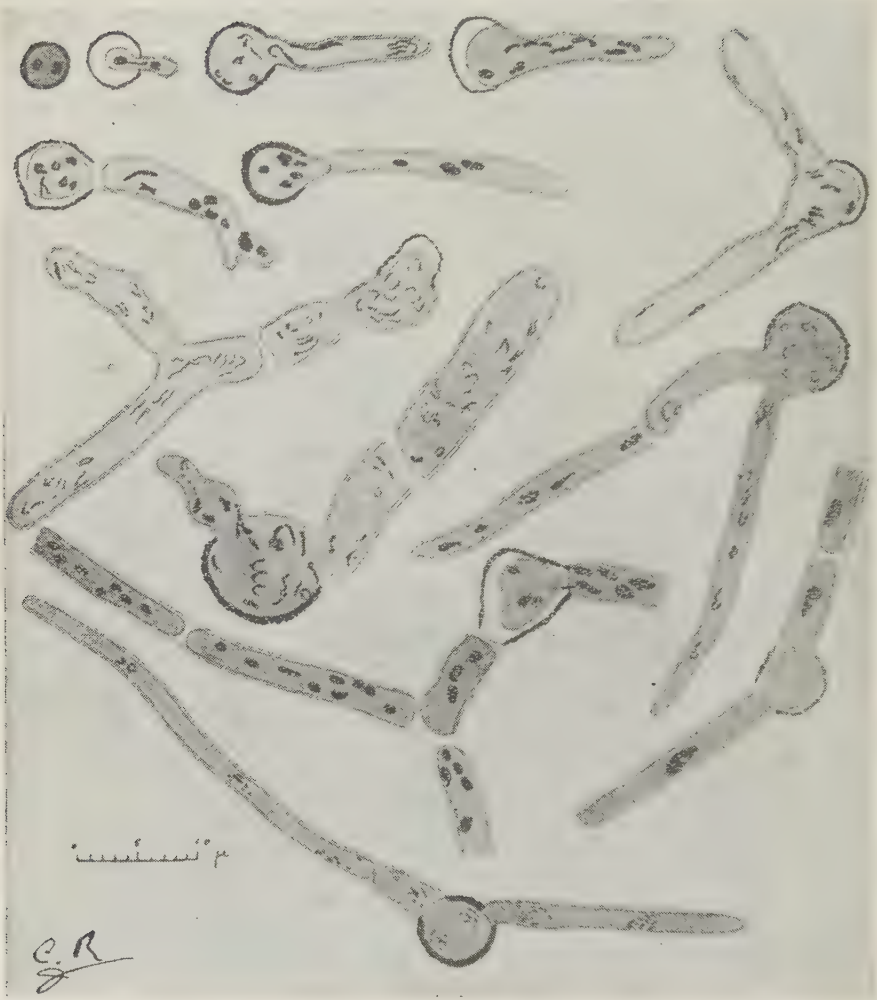


Aspergillus amstelodami IJFM 395. Ascosporas en germinación a las veinticuatro horas, a 25° C., teñidas según la técnica de Giemsa-Robinow. (Dibujadas con cámara clara.)



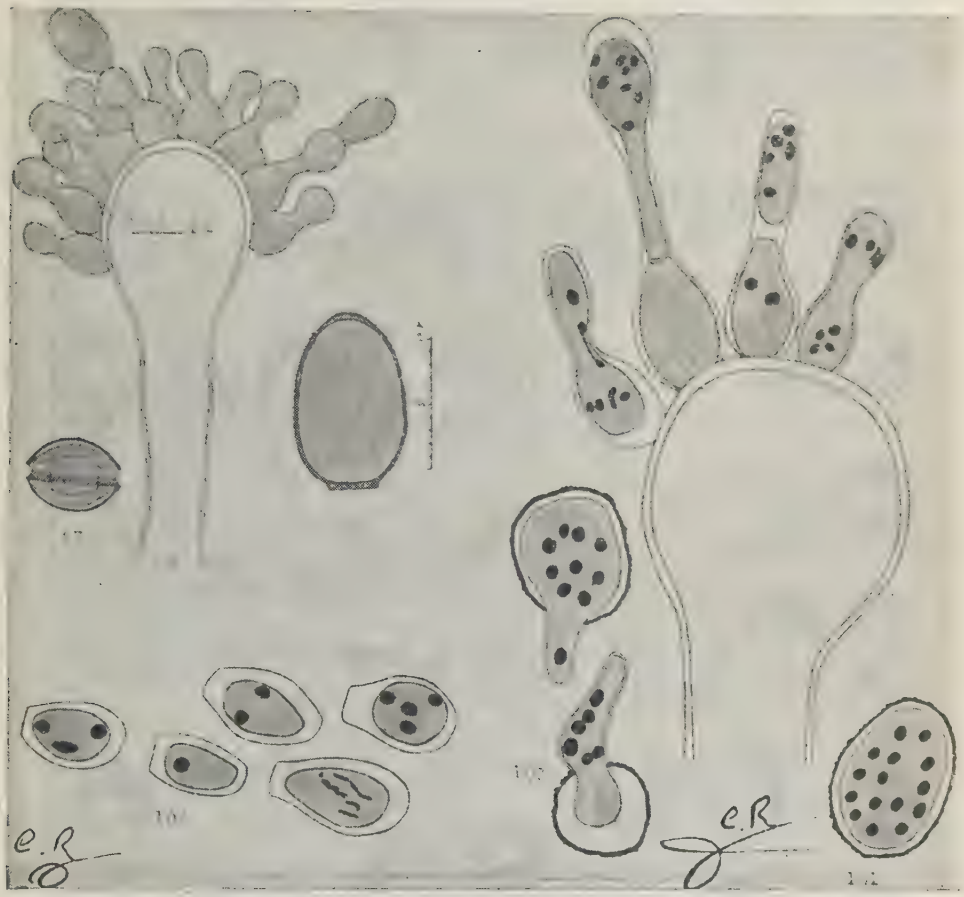
Aspergillus amstelodami IJFM 395 (72). Detalle de una cabezuela—(73). Formación de un peritecio por arrollamiento de dos hifas sexuales de distinto signo—(74). Detalle de la división nuclear en los esterigmas—(75, 76, 79, 80, 81). Desarrollo de las cabezuelas—(78). Ascosporas vistas de frente y de perfil—(77). Conidios maduros.—Tinción de Giemsa-Robinow. (Dibujos con cámara clara.)

LÁMINA IV



Aspergillus amstelodami IJFM 395. Conidios en germinación a las veinticuatro horas, a 25° C., teñidos según la técnica de Giemsa-Robinow. (Dibujos con cámara clara.)

LÁMINA V



Aspergillus ruber IJFM 397—(95). Cabezuela con esterigmas y conidios—(96). Conidio maduro—(97). Ascospora vista de perfil—(98). Detalles de vesícula y esterigmas, mostrando la división de los núcleos y formación de los conidios—(101). Conidio maduro plurinucleado—(99, 100). Conidios empezando a germinar—(102). Conidios no maduros, con los núcleos en división.—Tinción según la técnica de Giemsa-Robinow. (Dibujos hechos con cámara clara.)

Aspergillus ruber IJFM 397. Ascosporas en germinación, a las veintisiete horas de incubación, a 25° C., teñidas según la técnica de Giemsa-Robinow. (Dibujadas con cámara clara.)

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA MICROBIOLOGIA DE LOS EMBUTIDOS

POR

A. Socías (†) y J. Pérez Silva

Hace poco tiempo hemos publicado un trabajo (13), en el que llegábamos a la conclusión de que el *Bacillus subtilis* se encuentra de un modo normal en el pimentón. Teniendo en cuenta que este condimento se emplea para el aliño de algunos embutidos, decidimos hacer el análisis microbiológico de distintas muestras de estos productos alimenticios, con el fin de comprobar en ellos la presencia del *B. subtilis,* puesto que, como se trata de una bacteria productora de endosporos resistentes, lógicamente habrá de encontrarse en aquellos embutidos que contengan pimentón.

Al pretender consultar bibliografía acerca de esta materia sólo hemos encontrado publicaciones que versan sobre la presencia accidental de microorganismos que se han desarrollado en carnes en conserva, ocasionando alteraciones (4, 10, 12) del producto e, incluso, intoxicaciones alimenticias (9, 11); estos trabajos se refieren, más que a los embutidos, a carnes conservadas en lata.

Otros trabajos tratan de las condiciones en que se deben fabricar los embutidos para evitar el desarrollo de microorganismos; por ejemplo, Fievez (7) da normas para evitar que se desarrolle el *B. subtilis,* al que considera como el agente causal de las alteraciones del producto, y Gianelli (8) estudia las condiciones de fabricación con relación al desarrollo de *Staphylococcus* en el salchichón. También existen otros trabajos en los que se dan técnicas para el análisis microbiológico (5) y métodos para determinar el número de microorganismos (1).

Por último, la única publicación que hemos encontrado orientada hacia el análisis de conservas de carne no alteradas es la de Costilow y colaboradores (6), quienes aíslan levaduras del género *Debaryomyces* de salmueras comerciales de carnes; estos autores encuentran una gran uni-

formidad en los resultados, puesto que de 89 levaduras aisladas, 86 son identificadas como *Debaryomyces membranefaciens var. hollandicus Lodder*, y las tres restantes como *Debaryomyces kloekeri Guill. et Peju.*

Nosotros, por nuestra parte, orientamos los trabajos hacia el análisis microbiológico de embutidos que se encuentren en perfectas condiciones de conservación. Hemos verificado el análisis de muestras de diversos tipos de embutidos procedentes de distintas regiones españolas, y hemos visto a través de los resultados de nuestros experimentos que hay una flora normal para cada tipo de embutido, en la que hemos encontrado algunas variaciones de una región a otra, las cuales posiblemente podrían ser explicadas si se conocieran las plautas seguidas en la fabricación dentro de cada región.

MATERIAL

Hemos elegido para nuestro trabajo los embutidos más generalizados en España, entre los que consideramos dos grupos:

I) Embutidos que contienen pimentón.

Sobrasada.
Chorizo.
Longaniza.

II) Embutidos que no contienen pimentón.

Salchichón.
Mortadela.
Butifarra.
«Blanco de Murcia».

MEDIOS

Para conseguir el aislamiento hemos utilizado siempre placas de agar común y de agar-malta.

TECNICA

Para realizar el análisis microbiológico cualitativo operamos de la manera siguiente: Tomamos una pequeña porción de material de la zona central del embutido, procurando no tomar de la superficie externa, ya que en ésta existen, en la mayoría de los casos, hongos, principalmente mohos, que enmascararían los resultados, dificultando así el análisis.

Una vez extraída la pequeña muestra, se coloca en un tubo con agua destilada estéril y se agita hasta que se consiga una cierta turbidez. Entonces se siembra una gota de la suspensión en cada una de las placas, tanto de agar común como de agar-malta.

La temperatura de incubación fué siempre 25° C.

RESULTADOS

A las cuarenta y ocho horas de incubación ya se puede apreciar en ambos medios desarrollo microbiano, el cual presenta una significativa fijeza para cada clase de embutido.

A continuación expondremos en una serie de cuadros los resultados que, siguiendo las técnicas que acabamos de exponer, hemos obtenido de cada una de las muestras analizadas. En estas tablas sólo reseñamos aquellas muestras de las que conocemos con toda seguridad su procedencia.

Podemos adelantar que hemos aislado los cuatro microorganismos siguientes: *Bacillus subtilis*, una levadura perteneciente al género *Debaryomyces*, un *Corynebacterium* y un *Micrococcus*.

El *B. subtilis* y el *Corynebacterium* se desarrollaron en las siembras de embutidos hechas tanto en agar común como en agar-malta. El *Debaryomyces* sólo creció en las siembras hechas en agar-malta, mientras que *Micrococcus* sólo se desarrolló en las placas de agar común.

CUADRO I

MICROORGANISMOS AISLADOS DE DISTINTAS MUESTRAS DE *CHORIZO*

MUESTRA		Microorganismos aislados			
N.º	Procedencia	*Bacillus subtilis*	*Debaryomyces*	*Corynebacterium*	*Micrococcus*
1	Quintana Redonda (Soria)... ...	+	+	+	+
4	Quintana Redonda (Soria)... ...	+	+	+	+
5	Soria	+	+	+	+
2	B. de Porreros (Segovia)	+	+	+	+
3	Cantipalos (Segovia)	+	+	+	+
6	Cantipalos (Segovia)	+	+	+	+
7	Pamplona	+	—	—	—
8	Pamplona	+	—	—	—
9	Pamplona	+	—	—	—
10	Pamplona	+	—	—	—
11	Riego de la Vega (León)	+	+	+	+
12	Riego de la Vega (León)	+	+	+	+
13	Guijuelo (Salamanca)	+	+	+	+
14	Castuera (Badajoz)	+	+	+	+
15	Castuera (Badajoz)	+	+	+	+
16	Oropesa (Toledo)	+	+	+	+
17	Oropesa (Toledo)	+	+	+	+
18	Madrid	+	+	+	+
19	Madrid	+	+	+	+
20	Madrid	+	+	+	+
21	Torrijos (Toledo)	+	+	+	+
22	Torrijos (Toledo)	+	+	+	+
23	Torrijos (Toledo)	+	+	+	+
24	Torrijos (Toledo)	+	+	+	+
25	Torrijos (Toledo)	+	+	+	+
26	Puente Genil (Córdoba)	+	+	+	+
27	Puente Genil (Córdoba)	+	+	+	+
28	Puente Genil (Córdoba)	+	+	+	+
29	Puente Genil (Córdoba)	+	+	+	+
30	Almería (fabricación casera) ...	+	—	—	—

CUADRO II

MICROORGANISMOS AISLADOS DE DIFERENTES MUESTRAS DE *LONGANIZA*

MUESTRA		Microorganismos aislados			
N.º	Procedencia	*Bacillus subtilis*	*Debaryomyces*	*Corynebacterium*	*Micrococcus*
1	Piedrahita (Avila)	+	—	+	—
2	Piedrahita (Avila)	+	—	+	—
3	Piedrahita (Avila)	+	—	+	—
4	Quintana Redonda (Soria)	+	—	+	—
5	Quintana Redonda (Soria)	+	—	+	—
6	Riego de la Vega (León)	+	+	+	+
7	Riego de la Vega (León)	+	+	+	+
8	Guijuelo (Salamanca)	+	+	+	+
9	Madrid	+	+	+	+
10	Madrid	+	+	+	+
11	Madrid	+	+	+	+

CUADRO III

MICROORGANISMOS AISLADOS DE DIFERENTES MUESTRAS DE *SOBRASADA*

MUESTRA		Microorganismos aislados			
N.º	Procedencia	*Bacillus subtilis*	*Debaryomyces*	*Corynebacterium*	*Micrococcus*
1	Lluchmayor (Mallorca)...	+	—	—	—
2	Lluchmayor (Mallorca)...	+	—	—	—
3	Lluchmayor (Mallorca)...	+	—	—	—
4	Lluchmayor (Mallorca)...	+	—	—	—
5	Inca (Mallorca)	+	—	—	—
6	Inca (Mallorca)	+	—	—	—
7	Madrid	+	—	—	—
8	Madrid	+	—	—	—
9	Madrid	+	—	—	—
10	Madrid	+	—	—	—
11	Madrid	+	—	—	—
12	Madrid	+	—	—	—

CUADRO IV

MICROORGANISMOS AISLADOS DE DIFERENTES MUESTRAS DE *SALCHICHON*

MUESTRA		Microorganismos aislados			
N.º	Procedencia	*Bacillus subtilis*	*Debaryomyces*	*Corynebacterium*	*Micrococcus*
1	Gerona	—	+	+	+
2	Gerona	—	+	+	+
3	Gerona	—	+	+	+
4	Gerona	—	+	+	+
5	Quart (Gerona)	—	+	+	+
6	Olot (Gerona)	—	+	+	+
7	Olot (Gerona)	—	+	+	+
8	San Daniel (Gerona)...	—	+	+	+
9	San Feliu de Pallarols (Gerona).	—	+	+	+
10	Vich (Barcelona)	—	+	+	+
11	Vich (Barcelona)	—	+	+	+
12	Vich (Barcelona)	—	+	+	+
13	Pamplona	—	—	+	—
14	Pamplona	—	—	+	—
15	Pamplona	—	—	+	—
16	Pamplona	—	—	+	—
17	Pamplona	—	—	+	—
18	Villaornate (León)	—	+	+	+
19	Miranda de Ebro (Burgos)... ...	—	+	+	+
20	Miranda de Ebro (Burgos)... ...	—	+	+	+
21	Miranda de Ebro (Burgos)... ...	—	+	+	+
22	Miranda de Ebro (Burgos)... ...	—	+	+	+
23	Puente Genil (Córdoba)...	—	+	+	+
24	Puente Genil (Córdoba)...	—	+	+	+
25	Puente Genil (Córdoba)...	—	+	+	+
26	Puente Genil (Córdoba)...	—	+	+	+
27	Puente Genil (Córdoba)...	—	+	+	+
28	Hellín (Albacete)	—	+	+	+
29	Hellín (Albacete)	—	+	+	+

CUADRO V

MICROORGANISMOS AISLADOS DE OTROS EMBUTIDOS QUE NO CONTIENEN PIMENTÓN
(Todos ellos han sido fabricados en Madrid)

N.º	Embutido	*Bacillus subtilis*	*Debaryomyces*	*Corynebacterium*	*Micrococcus*
1	Butifarra	—	+	—	+
2	Butifarra	—	+	—	+
3	Butifarra	—	+	—	+
4	«Blanco de Murcia»...	—	+	—	+
5	«Blanco de Murcia»...	—	+	—	+
6	«Blanco de Murcia»...	—	+	—	+
7	«Blanco de Murcia»...	—	+	—	+
8	Mortadela	—	+	—	+
9	Mortadela	—	+	—	+
10	Mortadela	—	+	—	+
11	Mortadela	—	+	—	+
12	Mortadela	—	+	—	+

Como se puede observar en las tablas I, II y III, que corresponden a embutidos que contienen pimentón, aparece siempre el *Bacillus subtilis*, mientras que en los embutidos de las tablas IV y V no aislamos dicho bacilo en ninguno de los casos. Este hecho nos sugiere que el *B. subtilis* que encontramos en los embutidos es introducido con el pimentón empleado en la preparación del aliño.

Según nuestra opinión, el *B. subtilis* no ocasiona deterioro en los embutidos donde se encuentra; al menos los que nosotros hemos analizado no presentaban ningún indicio de alteración.

Las cepas de *B. subtilis* que hemos analizado de los embutidos presentan las mismas características morfológicas, tanto en el aspecto de las colonias (figs. 1, 2 y 4) como en preparación microscópica (fig. 5) que las aisladas del pimentón; además, su comportamiento bioquímico coincide exactamente con los resultados y datos que obtuvimos de las cepas aisladas del pimentón, y que ya expusimos en nuestra publicación anterior (13).

Otra de las bacterias que encontramos en casi todos los tipos de embutidos por nosotros analizados es un bacilo extraordinariamente pleo-

mórfico, como puede observarse en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10, donde no sólo varía ampliamente la longitud del bacilo, sino también su diámetro, el cual presenta incluso variaciones a lo largo de una misma célula. Este bacilo es inmóvil Gram-variable, la mayoría de las células son Gram-positivas, pero en algunas extensiones, sobre todo las hechas con cultivos viejos, de más de una semana, se pueden apreciar gran cantidad de células teñidas de rojo y muchas de ellas teñidas irregularmente, según bandas transversales azules y rojas (detalle que no se aprecia en las fotografías, porque éstas están tomadas en película ortocromática). Tanto en agar común como en agar-malta (fig. 4) forma colonias muy pequeñas (de menos de 0,5 mm. de diámetro), casi transparentes y con un ligero tinte amarillo. Crece bien en medio de patata y lo hace lentamente en la gelatina, sin llegar a licuarla. Produce ácido sin gas a partir de la glucosa y de la galactosa (a las cuarenta y ocho horas a 27° C.) y a partir de la sacarosa y maltosa (después de los cuatro días de incubación a la misma temperatura). No reduce los nitratos a nitritos.

Basándonos en los caracteres que acabamos de exponer, llegamos a la conclusión de que dicha bacteria pertenece al género *Corynebacterium*, pero nos vemos casi imposibilitados para determinar la especie porque no conocemos su procedencia exacta, dato necesario para saber a qué grupo pertenece de los establecidos en las claves que se dan en el Bergey's Manual (3).

Este *Corynebacterium* procede probablemente de los animales cuya carne se emplea en la fabricación de embutidos; pero también existe la posibilidad de que sea introducido con el agua empleada en la fabricación, o que proceda, incluso, de las personas que trabajan en dichas fábricas.

Otro de los microorganismos aislados de la mayor parte de los embutidos es una levadura cuyas células son esféricas u ovales (fig. 11), y que suelen producir más de una yema. Ha sido incluída en el género *Debaryomyces* por nuestro compañero doctor Ramírez, a quien agradecemos su atención.

En cuanto a la procedencia de esta levadura, no hemos podido llegar a una conclusión satisfactoria, puesto que no sabemos si es un contaminante habitual de la carne o si es introducida durante el proceso de fabricación de los embutidos. Por un lado, la idea de que pueda ser un contaminante de la carne la encontramos en el trabajo de Costilow,

Etchells y Blumer (6), quienes hacen el análisis microbiológico de botes de jamón en salmuera, y encuentran levaduras de este mismo género, *Debaryomyces;* por otro lado, el hecho de que no se encuentre en alguno de los embutidos, como, por ejemplo, en la sobrasada y en alguna de las muestras de longaniza, nos hace pensar que no viene forzosamente con la carne. Tampoco podemos asegurar que sea añadida con el aliño, porque, examinando el cuadro IV, vemos que la mayor parte de las muestras de salchichón contienen la levadura, y, sabiendo que este tipo de embutido lleva como condimento pimienta únicamente, hemos analizado varias muestras de pimienta y no hemos encontrado la levadura. Posiblemente se trata de una contaminación procedente del aire, pero esto tampoco explica el que no se encuentre en todos los embutidos.

Según las anteriores consideraciones, nos vemos forzados a admitir, aunque no lo hayamos comprobado experimentalmente, que el *Debaryomyces,* en un momento o en otro, llega a todos los embutidos; pero no siempre, según el tipo de embutido o las condiciones de fabricación, encuentra un ambiente apropiado para su desarrollo, progresando en unos embutidos y en otros no.

Por último, un cuarto microorganismo que hemos aislado de muchos de los embutidos es un coco, no móvil, Gram-positivo, y que se agrupa formando racimos (fig. 12). En agar común da lugar a unas colonias de tamaño variable (desde 1 a 4 mm. de diámetro), brillantes y con un pigmento blanco. Incluímos este microorganismo en el género *Micrococcus.*

A continuación (cuadro VI) se resumen los resultados de nuestros análisis, indicando el porcentaje de casos en los que se ha aislado cada uno de los cuatro microorganismos para los diferentes tipos de embutidos que hemos analizado.

CUADRO VI

PORCENTAJE DE CASOS EN QUE SE HA AISLADO CADA UNO DE LOS MICROORGANISMOS

Embutido	*Bacillus subtilis*	*Coryne-bacterium*	*Debaryo-myces*	*Micro-coccus*
Chorizo	100	83,3	83,3	83,3
Longaniza	100	100	54,5	54,5
Sobrasada	100	0	0	0
Salchichón	0	100	82,7	82,7
Butifarra, mortadela y «Blanco de Murcia»	0	0	100	100

Como ya hemos dicho, la idea que motivó este trabajo fué el investigar la presencia de *B. subtilis* en los embutidos que llevan pimentón y la no existencia en aquellos que no lo contienen. Esta idea ha quedado plenamente confirmada por nuestros resultados. No obstante, como fuimos observando que en la mayoría de los casos esta bacteria no se encontraba sola, sino que, además, existían otros microorganismos que se presentaban de una manera más o menos constante según el tipo de embutido, ampliamos el campo de nuestro trabajo al análisis microbiológico completo, al menos el de los microorganismos que se desarrollan en los medios de cultivo que hemos empleado y con las técnicas que hemos utilizado.

Aunque el número de muestras que hemos analizado quizá no sea lo suficientemente elevado como para sacar consecuencias correctas acerca de la microbiología de los embutidos, creemos, sin embargo, podemos hacer alguna contribución a este tema si destacamos algunos de los hechos que nos han parecido más significativos.

En líneas generales, hemos observado una gran uniformidad en cuanto a los microorganismos aislados de cada tipo de embutido; sólo hemos encontrado variación en los resultados de los análisis de las muestras de longaniza, y también en algunas muestras de chorizo y de salchichón, las cuales difieren del resultado general para el tipo de embutido correspondiente. Creemos que dichas divergencias sean debidas a diferencias regionales en las pautas de fabricación.

Haciendo caso omiso de estas diferencias regionales y fijándonos en los resultados más frecuentes, podemos admitir que cada tipo de embutido lleva su flora propia, la cual, posiblemente, interviene en el proceso de curación.

Finalmente, también hemos de hacer notar un hecho curioso observado a través de los resultados de nuestros análisis: se trata de la exacta correspondencia (comparar las dos últimas columnas de cuadro VI) entre los porcentajes de muestras que contienen *Debaryomyces* y los porcentajes de muestras que contienen *Micrococcus*, pero esta correspondencia es aún más estrecha que lo que se desprende de este cuadro, puesto que si examinamos todos los cuadros anteriores donde se detallan los microorganismos aislados de cada una de las muestras, veremos claramente que estos dos microorganismos están de algún modo relacionados entre sí, pòrque siempre que encontramos *Debaryomyces* aparece también el

Micrococcus, y cuando no existe uno tampoco se encuentra el otro. Este hecho, al que no le vemos una explicación fácil, nos parece digno de un estudio más detenido que ponga en claro las relaciones existentes entre ambos microorganismos.

CONSECUENCIAS

1. El *Bacillus subtilis* es introducido en los embutidos con el pimentón.
2. No parece que la presencia de *B. subtilis* cause deterioro alguno en los embutidos.
3. La flora microbiana de los embutidos presenta una significativa fijeza dentro de cada tipo de embutido.
4. Posiblemente el proceso de curación de los embutidos sea de naturaleza microbiana.
5. Dos de los microorganismos aislados, *Debaryomyces* y *Micrococcus*, se encuentran, al parecer, íntimamente relacionados entre sí.

RESUMEN

Se ha hecho el análisis microbiológico de 94 muestras de embutidos españoles, encontrándose el *Bacillus subtilis* en aquellas muestras que contienen pimentón y no encontrándose en las que no lo contienen. Además, se han encontrado otros microorganismos no relacionados con la presencia del pimentón, que son: bacterias pertenecientes a los géneros *Corynebacterium* y *Micrococcus* y levaduras pertenecientes al género *Debaryomyces*. Los autores suponen que la curación de los embutidos es un proceso de naturaleza microbiana.

SUMMARY

Microbiologycal analysis of 94 samples of spanish sausages were carried out. It was found *B. subtilis* in those containing paprika. *B. subtilis* was not detected in those without paprika. In adition, some others microorganisms, which were not related to paprika, were found. The authors assume that the curing of sausages is a process of microbial nature.

BIBLIOGRAFIA

(1) AYRES, J. C., and ADAMS, A. T. 1953. Ocurrence and nature of bacteria in canned beef. Food Technol., 7 (8): 319-323.

(2) BAUMGARTNER, J. G. 1946. Canned foods. An introduction to their microbiology. J. & A. Churchill Ltd. London.

(3) BERGEY, D. H.; BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., and HITCHENS, A. P. 1948. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. 6. Baltimore.

(4) BUTTIAUX, R., and BEERENS, H. 1955. Gas-producing mesophilis clostridia in canned meats, with improved techniques for their identification. J. appl. Bact., 18: 581-590.

(5) TUTTIAUX, R., et FLAMENT. 1951. L'analyse bacteriologique des semiconserves de viande. Tecnique et interpretation. Ann. Inst. Pasteur. Lille, 4: 145-180.

(6) COSTILOW, R. N.; ETCHELLS, J. L., and BLUMER, T. N. 1954. Yest from comercial meat brines. Appl. Microbiol., 2 (5): 300-302.

(7) FIEVEZ, L. 1954. Inhibition du developpement des cultures de bacillus du groupe «subtilis» par le nitrate potasique, le clorure sodique contenant 0,5 p. 100 de nitrites et l'acétate calcique. Application a la fabrication expérimentale de salamis et comportement de la flore microbienne. Ann. Méd. vétér., 98: 127-178.

(8) GIANELLI, F. 1953. Determinazione della curva di crescita e dei principali carattero colturali e biochimici degli stafilococchi dell'impasto di salami tipo felino durante la stagionatura. Atti. Soc. ital. Sci. veter., 7: 646-659.

(9) LUNDBECK, H.; PLAZIKOWSKI, U., and SILVERSTOLPE, L. 1955. The Swedish «Salmonella» outbreak of 1953. J. appl. Bact., 18: 535-548.

(10) MOSSEL, D. A., and INGRAM, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. J. appl. Bact., 18: 232-268.

(11) NIVEN, C. F., Jr. 1955. Significance of streptococci in canned hams. Ann. Inst. Pasteur. Lille, 7: 120-123.

(12) NIVEN, C. F., Jr.; BUETTNER, L. G., and EVANS, J. B. 1954. Thermal tolerance studies on the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat produts. Appl. Microbiol., 2 (1): 26-29.

(13) SOCÍAS, A., y PÉREZ SILVA, J. 1956. El «Bacillus subtilis» como flora normal del pimentón. Microbiol. Española, 9 (4): 383-396.

FIG. 1.

Aspecto, a las cuarenta y ocho horas de incubación a 25° C., de una placa de agar común donde se ha sembrado una suspensión de una muestra de chorizo. Se pueden apreciar colonias de *B. subtilis* (S), de *Micrococcus* (M) y de *Corynebacterium* (C).

FIG. 2.

Placa de agar-malta a las cuarenta y ocho horas de incubación, donde se sembró la misma suspensión que en la placa de la figura anterior. (Ver. fig. 4.)

FIG. 3.

Placa de agar-malta, en la que se ha sembrado una suspensión de una muestra de salchichón. Se observa abundantes colonias de *Corynebacterium* y algunas colonias de *Debaryomyces*.

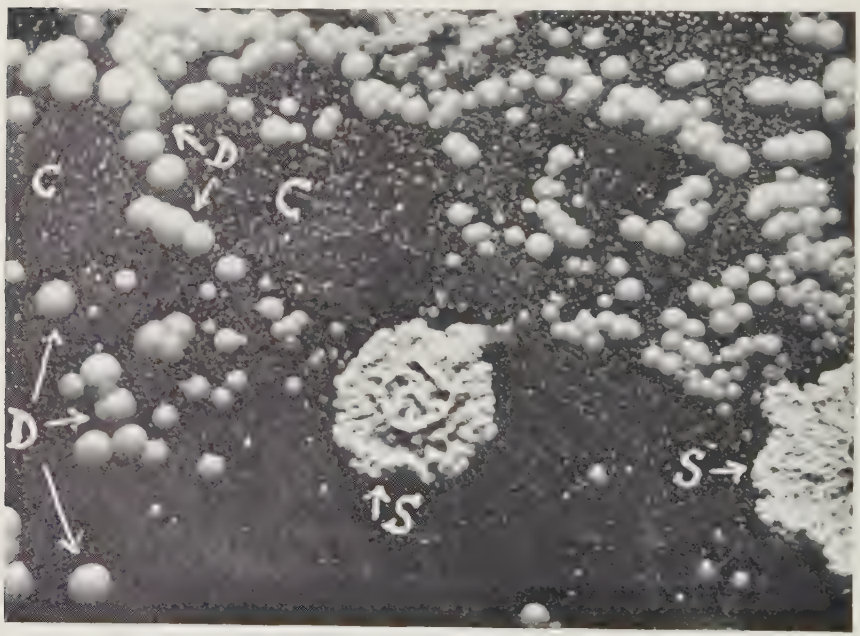


FIG. 4.

Detalle de la placa de la figura 2. Se aprecian claramente las colonias de los tres microorganismos: *B. subtilis* (S), *Debaryomyces* (D) y *Corynebacterium* (C).

FIG. 5.

Bacillus subtilis, aislado de los embutidos que contienen pimentón, a las cuarenta y ocho horas de incubación a 25° C.

FIG. 6.

FIGS. 6, 7, 8, 9 y 10.

Distintos campos de una extensión de *Corynebacterium* mostrando un gran pleomorfismo. A los cuatro días de incubación a 25° C.

FIG. 7.

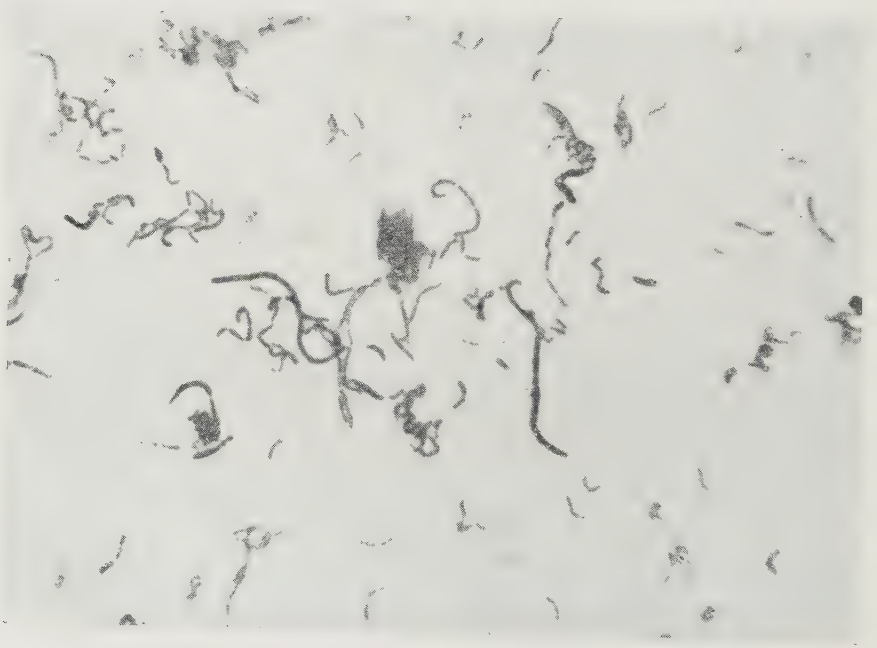


FIG. 8.

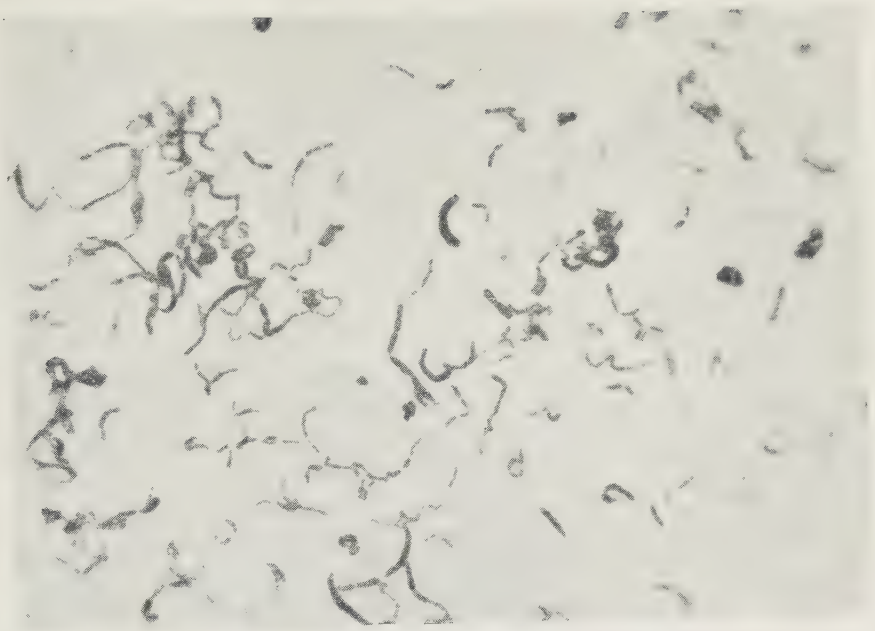


FIG. 9.

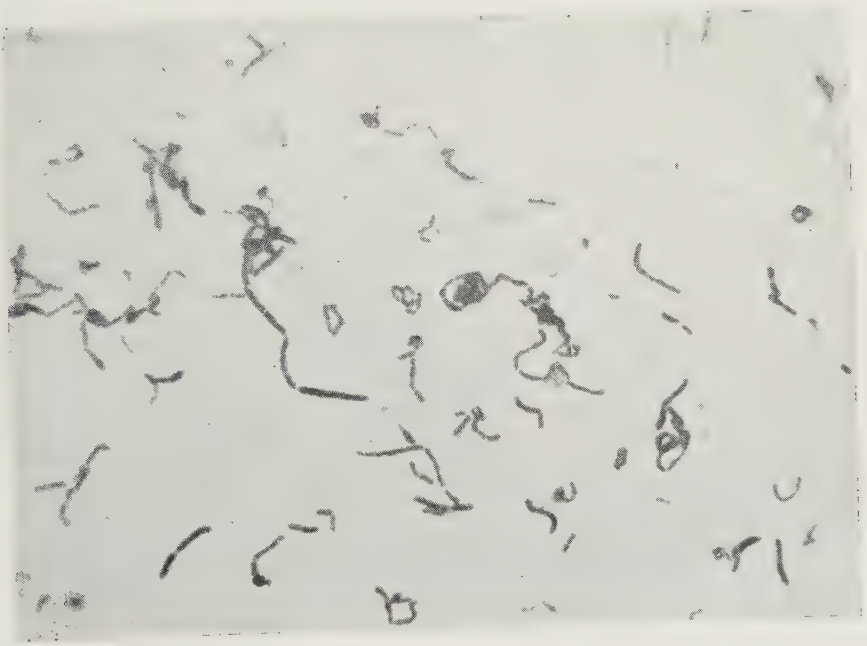


FIG. 10.

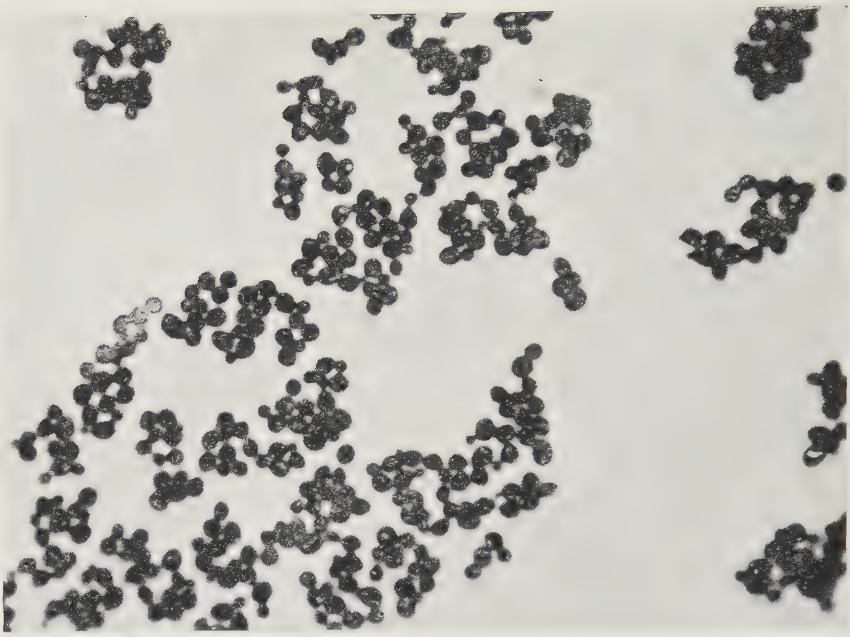


FIG. 11.

Aspecto microscópico de *Debaryomyces* cultivado en agar-malta. A los cinco días de incubación a 25º.

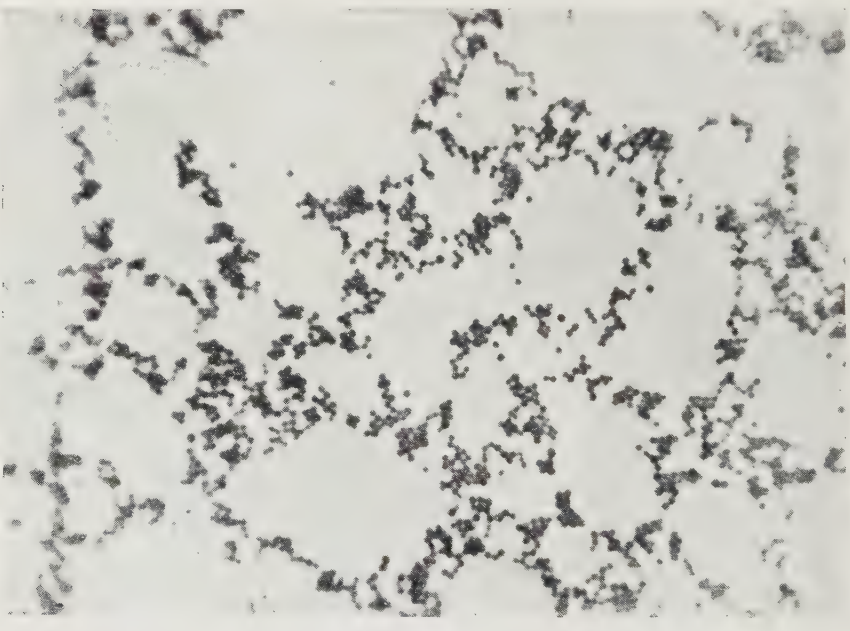


FIG. 12.

Micrococcus aislado de embutidos. Cultivado en agar común. Extensión hecha a las cuarenta y ocho horas de incubación a 25º C.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

CITOLOGIA Y CICLOS VITALES DEL GENERO *RHIZOBIUM* FRANK

POR

MIGUEL RUBIO HUERTOS y GENOVEVA TEJERINA DOMÍNGUEZ

INTRODUCCION

El género *Rhizobium,* por su importancia en la agricultura como simbionte fijador de nitrógeno y sus características morfológicas de gran variabilidad, ha sido extensamente estudiado desde los principios de la bacteriología, habiéndose llegado a las conclusiones, generalmente aceptadas, de que posee un ciclo vital con diversos estadios morfológicos, dependiendo de si se encuentra en los nódulos o en el suelo, y que su forma principal está constituída por bacilos cortos Gram negativos móviles y con las demás propiedades que se pueden encontrar en el «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology».

Recientemente, sin embargo, y casi a la vez, surgen una serie de trabajos en distintos países, donde, junto con la forma normal, se describe una forma bacilar pluricelular, de tamaño tres-seis veces mayor que aquélla, y que además es Gram variable y forma esporas.

En las experiencias realizadas en la Sección de Microbiología del Instituto de Edafología se ha estudiado el *Rhizobium* bajo diferentes aspectos y en los numerosos aislamientos de nódulos producidos en diferentes leguminosas, tanto nosotros como nuestros compañeros de Sección, hemos podido comprobar en muchos casos la presencia de estas grandes formas bacilares.

Bisset, en Inglaterra, hace formar parte a estas nuevas formas de un ciclo evolutivo general del *Rhizobium,* ciclo que luego estudiaremos con detalle. En Alemania, Heumann (1956) los hace formar parte de un ciclo sexual en formación de estrella. Todo esto de una manera bastante confusa y sin presentar unas pruebas convincentes.

Con gran interés por nuestra parte hemos procurado estudiar este problema, ya que lo creemos de la mayor importancia, tanto desde el punto de vista puramente científico como del práctico, por su relación

con la fijación de nitrógeno. Así hemos conseguido aislar en cultivos puros estas formas bacilares grandes para estudiarlas separadamente de las otras formas, y creyendo que por sus caracteres de cultivo, morfológicos y bioquímicos, no forman parte de un ciclo del *Rhizobium*, sino que constituyen una entidad aparte. Los datos de estos estudios, así como las razones para creer esto, las daremos más adelante en la exposición de la parte experimental.

ANTECEDENTES: CICLOS VITALES

Ciclo normal.

De los numerosos investigadores que han estudiado el género *Rhizobium* viendo su marcado pleomorfismo, algunos pensaron enlazar estos diversos estados morfológicos como distintos estadios de un ciclo vital (Löhnis, etc.), prevaleciendo en la actualidad el esquema de Thornton y Gangulee, que comprende seis fases o estadios en un ciclo vital completo.

1.° Fase inmóvil, cocoide, de un tamaño muy reducido, observada en cultivos en una solución neutra de suelo.

2.° Fase inmóvil, de formas cocoides mayores que las anteriores y obtenidas en presencia de ciertos hidratos de carbono y fosfatos.

3.° Fase de «swarmer», muy móvil, las células se han hecho ya elipsoidales.

FIG. 1.

4.° Fase de formas normales, es decir, bacilos cortos móviles, pero no tanto como los «swarmers».

5.° Formas bacilares inmóviles (dentro del nódulo).

6.° Formas vacuoladas o bacteroides, a veces ramificadas, y en las que la cromatina se divide en numerosas bandas. De estas bandas, que se convierten en formas redondeadas y se liberan, creen Thornton y Gangulee que provienen las formas de la fase 1, o cocoides, cerrándose así el ciclo.

Ciclo de Bisset.

En 1952 publicó K. A. Bisset una serie de observaciones y experiencias con más de 40 estirpes de *Rhizobium,* a consecuencia de las cuales presenta un nuevo ciclo vital de dicho microorganismo. En él aparece un elemento nuevo junto a las fases ya clásicas. Se trata de una forma bacilar de un tamaño mucho mayor que las formas hasta ahora conocidas del *Rhizobium,* y que además es producto de endosporas y Gram variable.

El ciclo, en resumen, es como sigue:

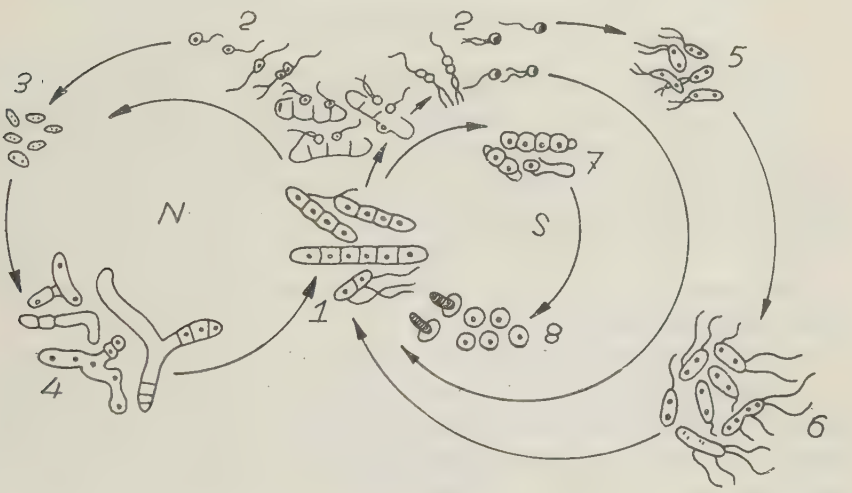


FIG. 2.

CICLO DE BISSET.—N. En el nódulo pequeñas bacterias (3) pasan a bacteroides (4).—S. En el suelo, endosporas (8) o «swarmers» (2) que se forman de bacilos grandes (1-2). Los «swarmers» se transforman en pequeños bacilos (5-6), los cuales pueden atacar los pelos de las raíces de plantas susceptibles o crecer de nuevo como bacilos grandes (1).

Por el dibujo podemos ver cómo la forma clave la constituyen estos grandes bacilos, los cuales se formarían en el suelo a partir de la forma normal del *Rhizobium*, es decir, de formas bacilares móviles Gran-negativas y mucho más pequeñas que él. De estos bacilos grandes y pluricelulares se forman, o bien los «swamers» por lisis de sus paredes celulares, o bien esporas, según el medio (humedad) en que se encuentran. Las esporas regenerarían la forma bacilar grande otra vez, y los «swarmers», por un lado, entrarían en la planta para formar los nódulos y en ellos dar lugar a los bacteroides, y, por otra parte, en el suelo darían la forma normal móvil y pequeña.

Como vemos, es un ciclo bastante complicado con muchas posibilidades de paso de unas fases o otras.

En una reciente publicación Bisset (1956) compara además la forma grande bacilar con el género *Azotobacter* y con el género *Bacillus*, encontrando entre ellos grandes analogías.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos.

Hemos utilizado la estirpe de *Rhizobium* núm. 1151, obtenida de nódulos de *Trifolium incarnatum*, procedente de Pontevedra, por el doctor Gregorio Fraile, a quien nos complacemos aquí en dar las gracias. Su cultivo contenía simultáneamente las dos formas, que llamamos N y G, que fueron separadas por aislamiento en placa de agar común y de medio 79, así como por ebullición de su cultivo en caldo, durante quince minutos, tiempo suficiente para destruir la forma N, quedando solamente la esporulada resistente.

Tanto de una como de otra se observa el aspecto macroscópico de sus colonias en los dos medios señalados, estudiando también su morfología en microscopio óptico corriente y de fases, así como en microscopio electrónico. Hemos utilizado como colorantes violeta de genciana y fucsina, para tinción simple, y los métodos de Gram y Wirtz para tinción diferencial.

El microscopio electrónico utilizado ha sido el del Instituto de Optica «Daza de Valdés», de Madrid, y es un modelo R.C.A. Las preparaciones fueron hechas por simple suspensión de las muestras en agua destilada

estéril sobre film de Formvar, y fueron sombreadas con paladio antes de su examen (*).

También se estudian los caracteres culturales y fisiológicos de ambas formas, recurriendo para ello a los medios de cultivo siguientes: caldo común, agua de peptona, medio de Voges-Proskauer, caldo gelatinoso, leche, caldo nitratado, medio con acetato de Pb y caldos azucarados con glucosa, lactosa, maltosa, manosa y sacarosa.

Los datos obtenidos en todas estas pruebas nos permiten llegar a establecer las cartas de identificación correspondientes a las dos formas N y G.

Su capacidad infectiva sobre leguminosas se comprueba en alfalfa y veza. Las semillas utilizadas se tratan con H_2SO_4 e hipoclorito, y después de un perfecto lavado con agua destilada estéril se distribuyen en placas sobre papel de filtro humedecido, donde germinan a 25° C. en estufa. Seleccionadas adecuadamente aquellas, que presentan un mismo desarrollo, se las pone en contacto durante unos minutos con las suspensiones, preparadas previamente de la forma N y de la G, siendo dispuestas a continuación en el medio en que han de desarrollarse. Este medio se prepara con solución de Crone, a la que se le añade 0,7 por 100 de agar, y se distribuye en grandes tubos de vidrio de fondo plano, de 4 cms. de diámetro y 30 cms. de longitud, de manera que alcance en ellos una altura aproximada de 10 centímetros.

De esta forma seguimos el desarrollo de la planta, pudiendo apreciar por la transparencia del tubo y del medio de cultivo si aparecen nódulos en sus raíces. Cuando éstos se presentan, y después que alcanzan un tamaño conveniente, son separados para practicar sobre ellos la siguiente técnica de aislamiento:

Se esteriliza la superficie del nódulo con una solución de cloruro mercúrico al 1 por 1.000, que se deja actuar durante dos-tres minutos; se lavan repetidas veces con agua estéril, y por corte y aplastamiento en porta se obtiene su contenido, que es sembrado por estría en placas de agar común y de medio 79. Las colonias que se desarrollan a 25° son estudiadas, de la misma forma que al principio indicamos, para su identificación.

(*) Damos las gracias al doctor F. Catalina, Jefe de la Sección de Microscopía Electrónica del Instituto «Daza de Valdés», por su valiosa ayuda.

RESULTADOS

Hemos obtenido dos tipos de colonias: unas, constituidas por formas que llamamos N (por creer que es la forma *normal* del *Rhizobium)* y otras, que llamamos G (sinónimo de grande). Estas formas G difieren completamente en su morfología de las formas N, así como en otros caracteres

Una vez aislados completamente por el método de dilución, y también al comprobar la formación de endosporas en la forma G, eliminando por ebullición durante quince minutos la forma N, procedimos a resembrar las formas aisladas en diferentes medios de cultivo para comprobar sus propiedades, realizando también el estudio morfológico por medio de tinciones adecuadas, y en vivo con el microscopio de contraste de fases.

A continuación exponemos los resultados obtenidos:

1.º *Morfología de las colonias.*

	Forma N	*Forma G*
En medio 79	Colonias redondas mucilaginosas, lisas, brillantes, blanquecinas y bastante transparentes.	Colonias redondas, lisas, brillantes, *no* mucilaginosas. y blancas *no* transparentes.
Agar caldo.	Colonias pequeñas redondas, lisas, brillantes y completamente transparentes.	Colonias grandes, redondas, opacas, sin brillo, blancas.

2.º *Caracteres bioquímicos* (véase Tabla núm. 1).

3.º *Caracteres citológicos.*

	N.	G.
Forma	bacilo	Bacilo pluricelular
Tamaño	1	3
Gram	negativo	Positivo
Esporas	No	posee endosporas y exosporas típicas
«Swarmers»	No	Sí
Formas L	Sí	No
Bacteroides	Sí	Sí

La formación de «swarmers» por la forma G la hemos podido observar en vivo con el microscopio de contraste de fases gracias a la adición al medio de cultivo de una solución estéril de glicocola al 5 por 100, ya

TABLA NUM. 1

CARACTERES BIOQUÍMICOS

	N	G
Caldo común.	Enturbiamiento y velo.	Enturbiamiento y sedimento.
Producción indol.	Negativa.	Negativa.
V-P	Negativa.	Negativa.
Gelatina.	Fluidificación estratiforme.	Fluidificación total.
Leche.	Coagulación y digestión.	Coagulación y digestión.
Reduc. nitratos.	Fuertemente positiva.	Débilmente positiva.
Produc. de SH_2.	Fuertemente positiva.	Negativa.
Asimil. glucosa.	Negativa.	Positiva sin gas.
» lactosa.	Positiva con gas.	Negativa.
» maltosa.	Negativa.	Negativa.
» manitol.	Negativa.	Positiva sin gas.
» sacarosa.	Negativa.	Positiva sin gas.

que sin la glicocola a las veinticuatro horas forma esporas típicas; con la adición de glicina se observa un ensanchamiento de los bacilos pluricelulares y aparecen vacuolas en el interior de cada célula, vacuolas que se agrandan, y dentro de las cuales se pueden ver pequeños gránulos dotados de gran movimiento. Las paredes celulares empiezan a lisarse por un extremo de la forma G y van liberando estos gránulos, que son los «swarmers» a los que se les puede ver pululando en el medio líquido de la preparación (foto núm. 7). Resembrando estos «swarmers» en nuevo medio de cultivo, se obtienen otra vez los bacilos grandes G.

Posteriormente hemos hecho preparaciones para el microscopio electrónico de las formas G en la fase de producción de «swarmers», pudiendo observar claramente en las electromicrofotografías obtenidas las células G rotas y los «swarmers» saliendo de ellas.

Los «swarmers» vistos al microscopio electrónico son esféricos y su tamaño varía de 0,1 micras a 0,3 micras; algunos se ve que poseen un flagelo largo y ondulado que parece estar formado por dos fibras enrolladas en espiral (foto núm. 10).

Estas observaciones coinciden completamente con las descritas por Bisset en la formación de «swarmers».

La forma N, por el contrario, al añadirle glicina, en vez de formar «swarmers» sufre un proceso de transformación morfológica que dura de seis a ocho días, durante el cual pasa por diferentes fases, que, excepto la primera, podemos considerar como pertenecientes a un ciclo L típico. Las fases son las siguientes:

a) Formación de facteroides (foto núm. 3).

b) Los bacteroides forman largos filamentos, desaparece su aspecto vacuolado y aparecen en algunos puntos de los filamentos engrosamientos redondeados (foto núm. 13).

c) Los engrosamientos se desprenden de los filamentos, que se desintegran, y dan formas típicas de las formas L (foto núm. 15).

d) En esta fase no se encuentran más que formas redondas que crecen y se desintegran, dejando libre gránulos de tamaño tan pequeño que quedan fuera del poder resolutivo del microscopio corriente, y sólo son visibles cuando están formando masas granulares.

Estas masas granulares, una vez resembradas en nuevo medio de cultivo sin glicocola, dan lugar de nuevo a formas normales típicas.

Por todo lo que hemos expuesto se ve que existen grandes diferencias entre la forma N y la G, y cada una de ellas, además, parece tener un ciclo independiente.

Para asegurarnos aún más de la independencia de las formas N y G, es decir, para comprobar que no son formas que pertenezcan a un ciclo común, además de las experiencias *in vitro*, en las cuales, a pesar de los diferentes medios de cultivo empleados y sustancias añadidas, como glicocola, *el paso de las formas N a G, o viceversa, nunca se ha realizado*, pensamos en la posibilidad de que este paso se efectuase dentro del nódulo en la planta infectada; para ello realizamos la siguiente experiencia:

Inoculamos semillas de veza y de alfalfa con cultivos puros, por separado, y se hicieron germinar y crecer las plantas infectadas en medio de cultivo estéril en tubos largos.

Al mes y medio se observó en las raíces de las planta obtenidas con semillas inoculadas con el *Rhizobium* N que se habían formado algunos nódulos (solamente en todas las plantas de alfalfa y en ninguna de veza). En el lote inoculado con la forma G también aparecieron algunos de ellos, siendo de aspecto y tamaño semejante a los producidos por el N.

De los nódulos se hicieron aislamientos en placa y en agar inclinado, pudiendo comprobar que de los nódulos producidos por la forma N se

obtenía otra vez la forma N pura, y de los producidos por la forma G, la forma G; por lo tanto, *tampoco se había producido el paso de una forma a la otra «in vivo»*.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El hecho de encontrarse juntos en materiales patológicos diversas fases del ciclo vital de una bacteria con morfología diferente, e incluso encontrarse también a la vez diferentes estirpes de un mismo género, no es un hecho raro en bacteriología; ahora bien: creemos que no se puede decir que dos microorganismos de diferente morfología y propiedades son fases de un mismo ciclo vital, sin presentar pruebas del paso de una a la otra forma, tal como se ha hecho, por ejemplo, con el ciclo «L» de algunas bacterias, donde se ha podido seguir por microscopía de contraste de fases y electrónica los pasos de unas formas a otros (11). En otros casos también se ha visto cómo de cultivos puros de hongos y levaduras se formaban formas bacilares (12 y 13).

En el caso del *Rhizobium*, Bisset explica perfectamente la citología de las diversas formas y sigue paso a paso la formación de «swarmers» y esporas en las formas bacilares grandes (G); sin embargo, al componer con todas estas formas un ciclo vital completo, este autor no prueba en absoluto el paso de la forma grande a la normal, limitándose a decir que los de la forma G pasan a dar la forma normal. En las experiencias realizadas por nosotros de los «swarmers» de la forma G hemos obtenido siempre la forma G otra vez, nunca la N.

El haber probado *in vitro* por medio de siembras en muy diversos medios de cultivo y añadiendo a estos sustancias conocidas como desencadenadoras de ciclos (glicocola), sin haber conseguido observar el paso de la forma N a la G, y viceversa; aunque conseguimos el ciclo «L» completo en la forma N y la formación de «swarmers» y bacteroides en la G, nos hizo dudar de la identificación de estas dos formas en un ciclo común.

Más tarde, al realizar infecciones sobre plantas en medio estéril y de los nódulos formados recuperar solamente la bacteria con la cual se había infectado (N o G puras), más que acrecentarnos esta duda, nos ha hecho pensar definitivamente en que las formas N y G no forman parte de un ciclo común, aunque se encuentren *asociadas* con cierta frecuencia infectando las mismas plantas.

Además, en la parte experimental hemos visto cómo las formas N y G difieren grandemente entre sí, especialmente en su morfología, tamaño y formación de esporas y conducta frente a los colorantes. En realidad la formación de esporas, el tipo de colonias y el tamaño y el ser Gram variable con tendencia a positivo coloca a la forma G fuera del género *Rhizobium* y la acerca al género *Bacillus,* como reconoce Bisset. Por otra parte, hemos podido probar que la forma G es capaz de producir nódulos en plantas de alfalfa en medio estéril. Es posible, por tanto, que nos encontremos en presencia de un nuevo género de bacterias, aunque nuestras experiencias, por el momento, no creemos sean lo suficientemente extensas para poder clasificar propiamente esta forma bacteriana.

RESUMEN

Hemos estudiado el ciclo vital de diferentes estirpes de *Rhizobium,* habiendo aislado en cultivos puros dos formas fundamentales: una, la normal, y otra, que hemos llamado G (grande) por su mayor tamaño, ambas formas, según Bisset, pertenecerían a dos diferentes estadios de un ciclo vital del *Rhizobium;* pero, según nuestros estudios, en los que hemos podido comprobar las grandes diferencias existentes entre ambas formas, morfológicamente, en su comportamiento frente a los colorantes, en la formación de esporas y en sus reacciones bioquímicas y fisiológicas, y sobre todo no habiendo podido observar el paso de una forma a la otra en ninguna circunstancia, tanto *in vitro* como *in vivo,* creemos que no forman parte de un ciclo vital común a ambas, sino que son entidades independientes que se encuentran a veces asociadas.

SUMMARY

Two forms of bacteria, the typical normal small Gram negative *Rhizobium* (N) and large occasionally Gram positive forms resembling Bacillus called G (for Grande = Big) which produced both specialized, small cocoid swarmers and resistent spores were found from nodules of a wide variety of legumes.

From one of these (strain 1151) the two forms were isolated in separate pure culture.

Their cytology was studied by normal, phase-contrast and electron microscouy; their biochemical reactions and colony formation were also studied.

The two forms differ very much in their cytology and colony formation and biochemichal reactions. The «L» cycle was induced in the N form by 5 × 100 glycine solution but this was not possible in the G, form which produces swarmers in a glycine containing medium.

In experiences of inoculation to alfalfa in steril medium both forms separately nodulated. From these nodules pure forms (in the nodules inoculated with N- the N form and in the nodules inoculated with the G form) were recovered.

We did not observed any transformation or pass from one form to another in any case. Nor in vitro in the different culture media used neither in vivo throught nodule infection. Therefore we think that these two forms are not different forms of the same bacterium in a commun life-cycle (as it has been described by Bisset) both are independent from each other although they are found comonnly associated infecting the same plants in the field. The large G from could perhaps belong to a new genera of bacteria.

BIBLIOGRAFIA

(1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Sixth. ed. 1948. Williams Wilkins Company. Baltimore.

(2) Bisset, K. A., and Hale, C. M. F. 1951. The production of swarmers in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 5, 952.

(3) Bisset, K. A. 1952. Observations on the morphology and natural relationships of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 6 i.

(4) Bisset, K. A. 1952. Complete reduced life cycles in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 7, 233-242.

(5) Cabezas de Herrera, E. 1956. Acción de la luz ultravioleta sobre los *Rhizobium*. Microbiol. Españ., 9, núm. 4, 397-420.

(6) Cabezas de Herrera, E. 1956. Acción del pH sobre los *Rhizobium*. Anal. Edaf., XV, núm. 2, 167-184.

(7) Fraile Ramos, G. 1955. Estudios sobre nódulo-bacterias. Michobiol. Españ., 8, número 3, 249-326.

(8) Hale, C. F. M., and Bisset, K. A. 1956. A comparison of the staining reactions of the cell walls of *Azotobacter chroococcum* and those of Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Gen. Microb., 15, 423.

(9) Heumann, W. 1956. Der sexualcyclus sternbildender Bakterien. Archiv. für Mikrobiologie. 24. Band. 362-395.

(10) Löhnis, F. 1921. Studies uson the life cycles of the bacteria Pt. 1 Review of the literature 1838-1918. Ntl. Acad. Sci., 16: Mem. Washington.

(11) Rubio Huertos, M. Küster, E., und Flaig, W. 1955. Licht-und elektronenmikroskopische untersuchungen an L-formen bei *Pseudomonas fluorescens, B. proteus* und *Rhizobium*. Zentr. für Bakt. Paras, Infk und Hyg. I. Orig.

(12) Socías Amorós, A., y Sierra, G. 1951. El factor de transformación mohobacteria. Microbiol. Españ., IV, núm. 1, 23-31.

(13) Socías, A., y González, C. 1952. Ciclo vital levadura-bacteria. Microbiol. Españ., V, 3-4, 169-176.

(14) Tejerina Domínguez, G. 1956. Nuevos medios de cultivo de *Rhizobium* para infección técnica. Anal. Edaf., XV, núm. 2, 63-84.

(15) Thornton, H., and Gangulee, N. 1926. The life-cycle of the nodule organism *Bacillus radicicola* (Beij) in soil and its relation to the infection of the host plant. Roy. Soc. (London). Proc. Ser. B., 99.

Foto 1.
Rhizobium N (Normal). Microscopio electrónico. × 14.000.

Foto 2.
Rhizobium G (Grande). Microscopio electrónico. × 14.000.

Foto 3.

Fotos 3 y 4.
Rhizobium N. Bacteroides y formas normales en cadena. Microscopio corriente. × 1.500.

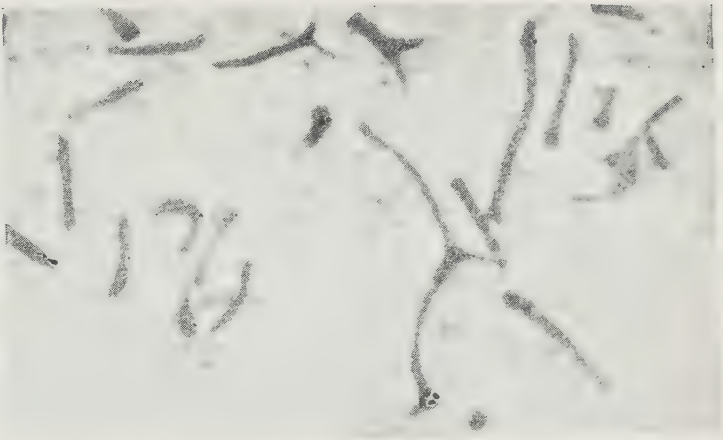
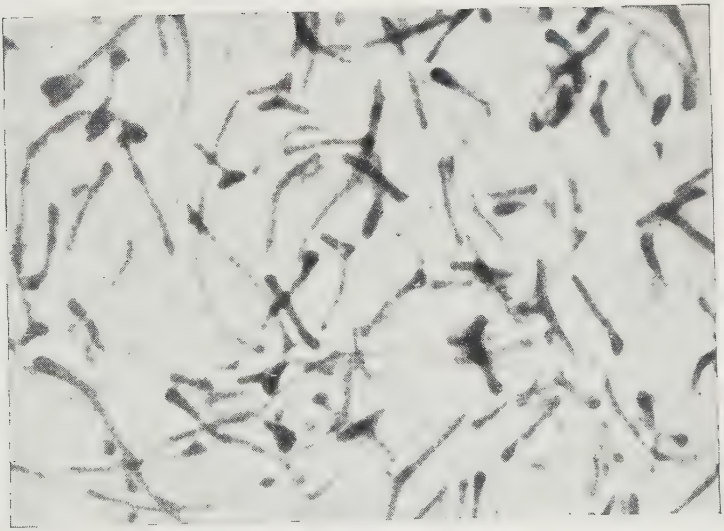


Foto 5.



Fotos 5 y 6.

Rhizobium G. Bacteroides. × 1.500.

Foto 7.

Rhizobium G. Formas normales, algunas hinchadas y los «swarmers» alrededor. Microscopio de contraste de fases. × 2.500.

Foto 8.

Rhizobium G. Formas cortas, redondeadas, en alguna de ellas se pueden ver los «swarmers» dentro. Microscopio de contraste de fases. × 1.500.

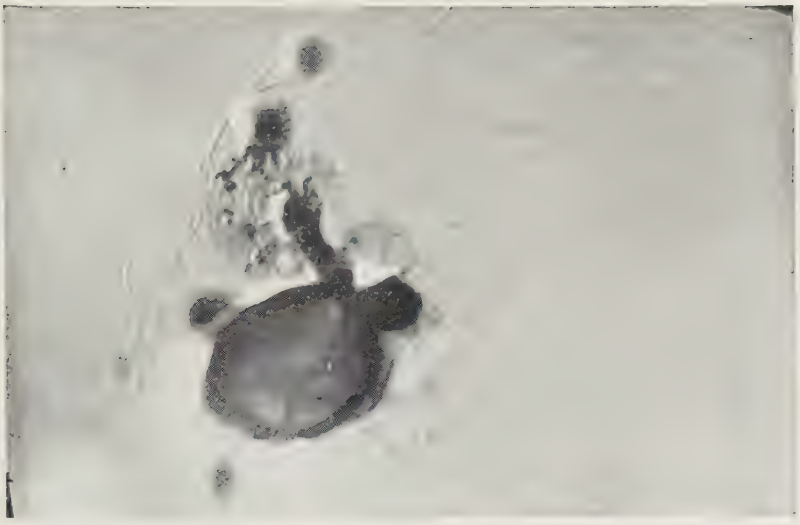


Foto 9

Fotos 9, 10 y 11.

Rhizobium G. Formas redondeadas, vacías, y a su alrededor los «swarmers» con pequeñas esférulas, algunas con flagelos. Microscopio electrónico. × 14.000.

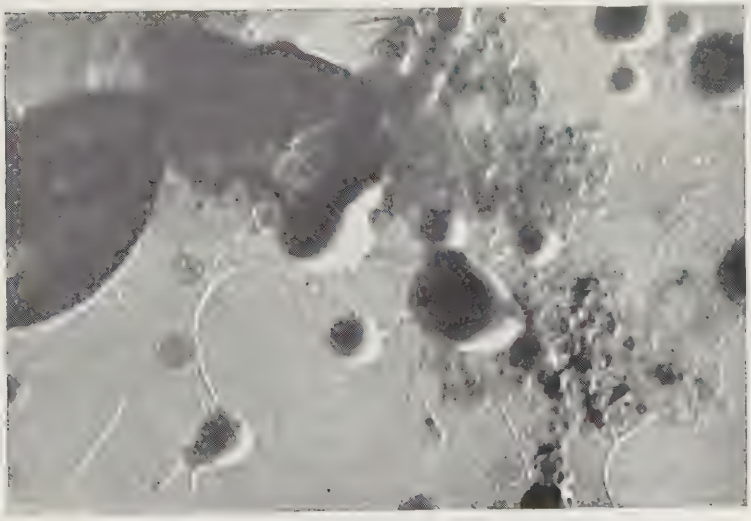


Foto 10.

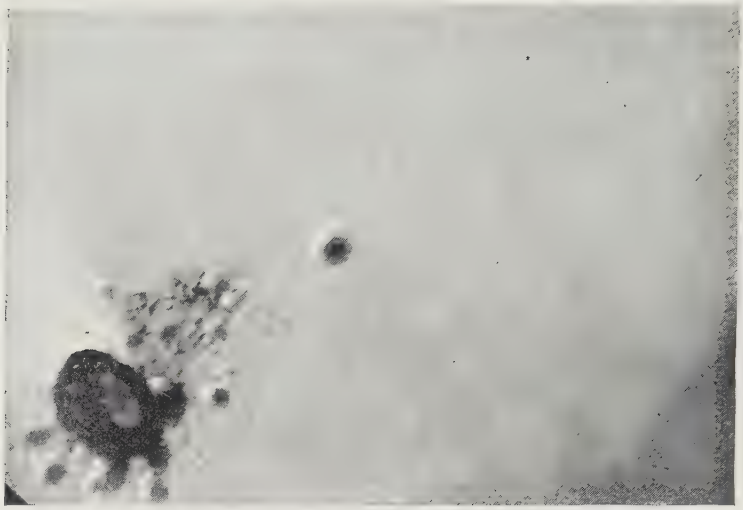


Foto 11.

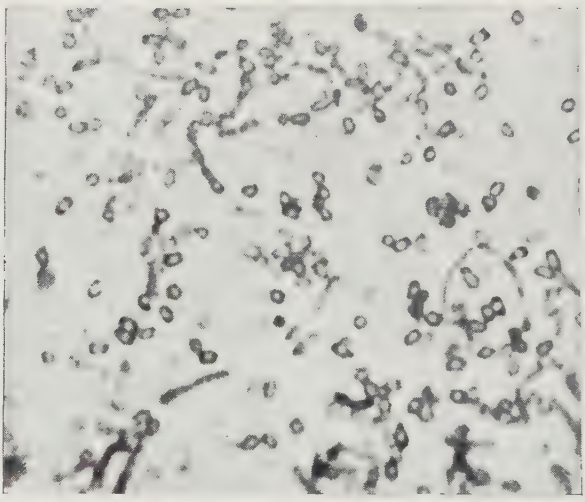


Foto 12.

Rhizobium G. Formas normales con gran número de exosporas. Microscopio corriente, tinción de Wircht. × 1.000.

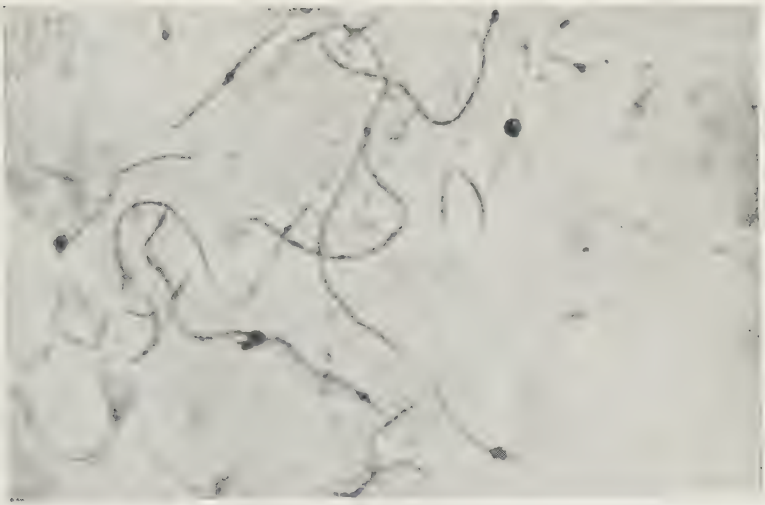


Foto 13.

Rhizobium N. Comienzo de las formas L. Filamentos con engrosamientos al añadir glicina al 5 por 100. Microscopio corriente. × 1.500.

Foto 14.

Igual a la anterior, pero vista al microscopio electrónico. × 14.000.

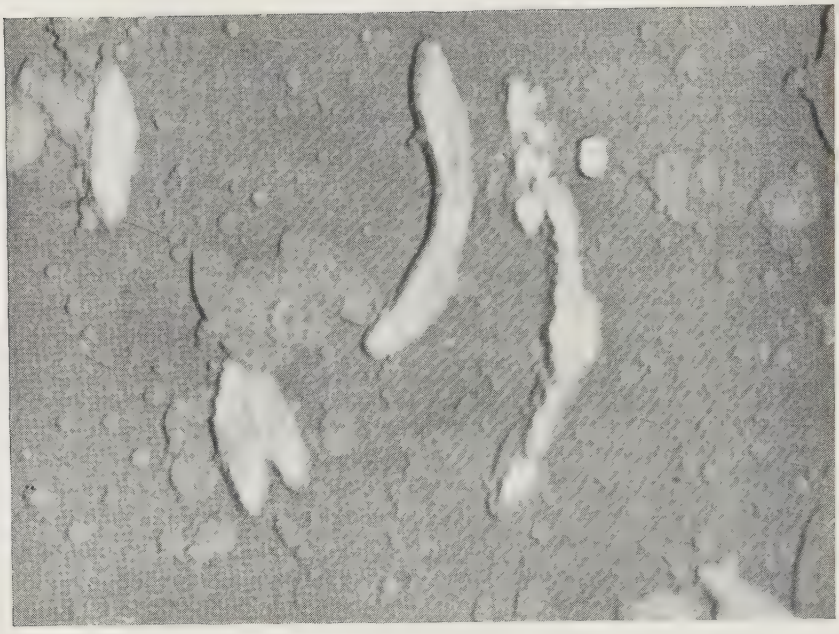


Foto 15.

Formas intermedias y formas enanas o filtrables del ciclo «L» de la forma N. Microscopio electrónico. × 14.000.

C. S. I. C.
PATRONATO "JUAN DE LA CIERVA"
INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS. SEVILLA (HELIOPOLIS)

INFLUENCIA DEL pH Y LA SALINIDAD EN EL DESARROLLO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

POR

ANTONIO IZQUIERDO TAMAYO

En trabajos anteriores (4-5-6) nos hemos ocupado del proceso microbiano de fermentación de aceitunas verdes; como principal causante de la fermentación hemos aislado siempre la especie *Lactobacillus plantarum*. Dado que, en las salmueras, los lactobacilos se desarrollan siempre en presencia de cantidades más o menos grandes de sal, nos pareció interesante investigar la influencia de la salinidad en la multiplicación de la citada especie, y para ello empleamos el método de cultivos puros en infusión de alfalfa, ya que este medio está reputado como uno de los más óptimos para el desarrollo de los *Lactobacillus* (7).

Tenían nuestras experiencias un doble interés: primero, el estudio que queda esbozado en las líneas anteriores, como una modesta contribución al conocimiento de la ecología de los bacilos lácticos; en segundo lugar, la iniciación al estudio de la preparación de cultivos puros de lactobacilos, para añadirlos a las salmueras, según se viene haciendo ya en otros países, incluso en España (véase 3).

El procedimiento seguido ha sido, por consiguiente, la siembra de cepas de *Lactobacillus plantarum* (aisladas por nosotros de salmueras de aceitunas) en matraces conteniendo infusión de alfalfa, a la que se adicionaba el 2 por 100 de glucosa; dichos matraces eran incubados en estufa a 30°, por ser ésta la temperatura al parecer óptima para el desarrollo de dicha especia bacteriana (4). Periódicamente se realizaba la siembra en placas por el método de las diluciones y se hacía el recuento de colonias; al mismo tiempo se determinaba la acidez libre y el pH. En los casos en que interesaba se le añadía a la infusión de alfalfa una proporción conocida de cloruro sódico, al propio tiempo que se ajustaba a un pH

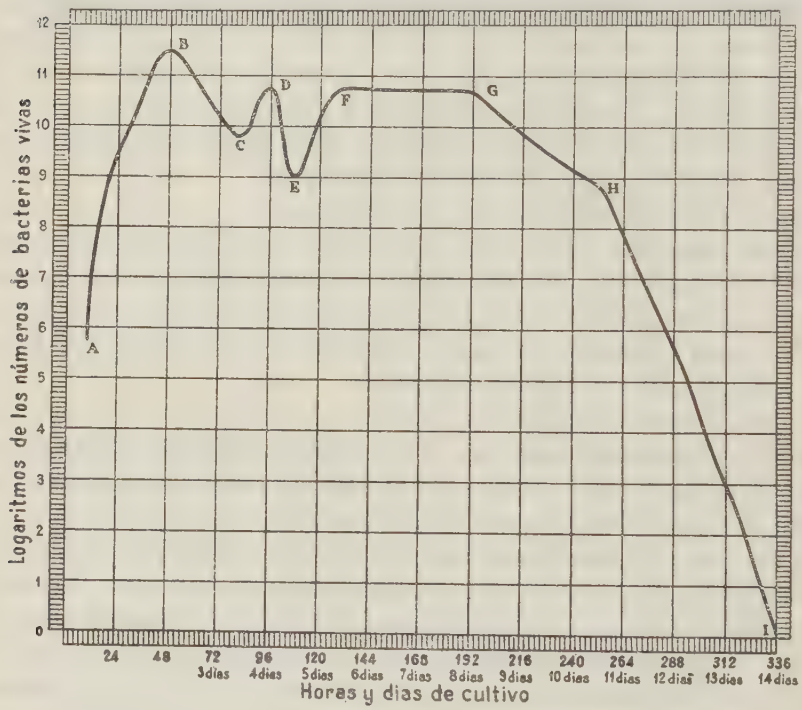
determinado. Cada experiencia se daba por terminada cuando no se desarrollaban colonias al realizar las siembras.

En la ingrata labor de siembras y conteos hemos tenido siempre la valiosa ayuda y colaboración de nuestra laborante señorita Ana María Navas Riao, a la cual nos complacemos en expresar, una vez más, nuestro reconocimiento.

DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS Y DISCUSION

I. *Cultivo en infusión de alfalfa, a pH 7, con el 2 por 100 de glucosa.*

La cepa utilizada es la 16-L, seleccionada como una de las mejores entre todas las aisladas por nosotros. Los resultados de los recuentos se



GRÁFICA I.

recogen en el Cuadro I y se expresan gráficamente en la Gráfica I. La curva de crecimiento sigue, en sus líneas generales, la marcha característica de todo cultivo bacteriano (Véase Topley y Wilson) (9).

1.° La fase AB (véase Gráfica I), en la cual, tras un período de latencia, no completamente investigado en nuestro caso, se inicia una multiplicación lenta. A las doce horas tiene lugar la fase logarítmica de multiplicación, en la que el número de lactobacilos pasa de 546.240 por centímetro cúbico a 1.605 millones por centímetro cúbico en tres horas, lo que representa un aumento de casi 1.604 millones y medio por centímetro cúbico en dicho período de tiempo. La multiplicación sigue un ritmo ascendente hasta las cuarenta y ocho horas de cultivio, en el que alcanza la cifra máxima.

2.° A partir de las cuarenta y ocho horas se inicia un descenso; en él pueden observarse altibajos, según es característico en la fase de declinación de todo cultivo bacteriano. De las cuarenta y ocho a las ochenta y cuatro horas hay una disminución en el ritmo de multiplicación (BC), lo que trae como consecuencia una cifra menor de lactobacilos por centímetro cúbico al cabo de este tiempo. En el período de doce horas comprendido entre las ochenta y cuatro y noventa y seis horas el ritmo es más rápido (CD), para disminuir nuevamente a las ciento ocho horas (DE), y otra vez es más rápido de las ciento ocho horas a las ciento treinta y dos horas (EF). Se observan, por consiguiente, tres máximos en el desarrollo: uno (B), el que alcanza la cifra más alta, a las cuarenta y ocho horas, precedido de la fase logarítmica de multiplicación (AB) y seguido de una fase de declinación (BC); un segundo máximo (D) a las noventa y seis horas, igualmente con una fase previa de multiplicación (CD) y una declinación (DE) posterior; un tercer máximo (F) se logra a las ciento treinta y dos horas, tras un período de multiplicación (EF).

3.° De las ciento treinta y dos horas (cinco días y medio) a las ciento noventa y dos horas (ocho días) se estabiliza la curva, aunque con un leve descenso, lo que indica un período estacionario en el cultivo. En las curvas típicas este período sigue al de multiplicación logarítmica; en nuestro caso sobreviene, como hemos visto, después de varios descensos y ascensos en ella, correspondientes a nuevos períodos de multiplicación. Estos varios períodos de multiplicación se deben a la hidrólisis de los polisacáridos de la infusión de alfalfa, lo que proporciona nuevas cantidades de azúcares disponibles para su utilización por los lactobacilos. Hay

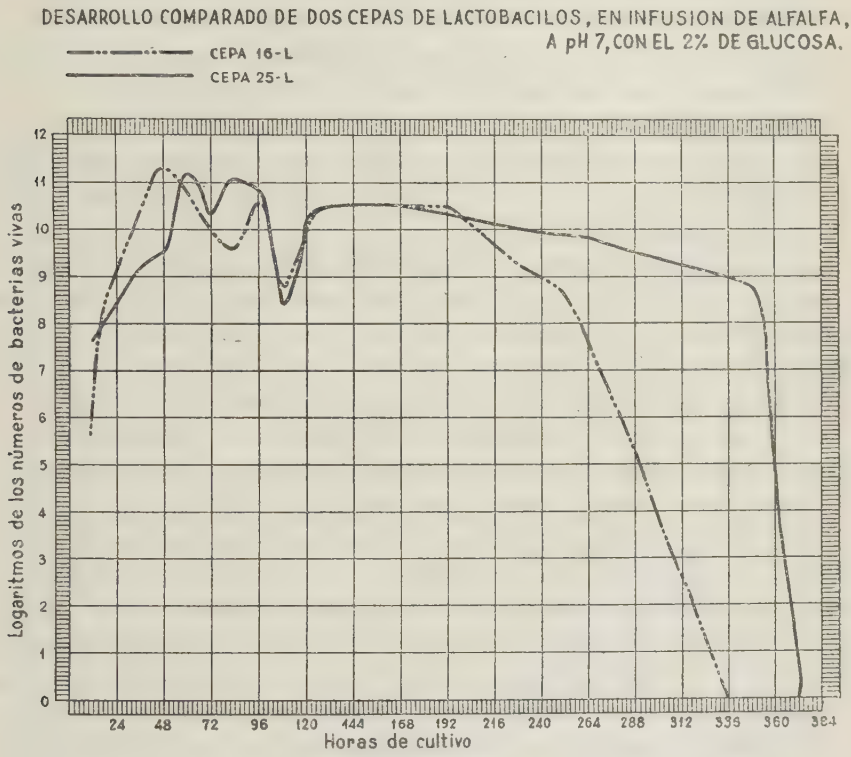
aquí también, seguramente, un fenómeno de adaptación y selección a la más elevada proporción de acidez libre y bajo pH que, progresivamente, ofrece el medio. Así, pues, primeramente, los lactobacilos utilizando la glucosa del medio producen cantidades de ácido láctico libre del 0,09 por 100 y hacen descender el pH de 7 a 5 en doce horas. Este pH les es óptimo, y como resisten perfectamente la cifra de acidez indicada, continúan multiplicándose activamente, con lo cual la acidez aumenta (a 0,73 grs. por 100) y el pH disminuye a 3,75 a las cuarenta y ocho horas. Entonces se detiene el desarrollo y muchas bacterias mueren a consecuencia de no poder desarrollarse con las citadas cifras. Las que quedan, al hidrolizarse los polisacáridos, reciben un nuevo aporte de azúcar; las que comienzan ahora a multiplicarse son las que, mediante una selección, han sido capaces de soportar aquella acidez libre y aquel pH, dando origen al nuevo máximo de las noventa y seis horas, con una acidez ya del 1,06 por 100 y un pH 3,5; por un proceso análogo sobreviene una nueva declinación y otra fase de multiplicación. Los lactobacilos capaces de soportar una acidez libre del 1,08 por 100 y un pH de 3,5 se multiplican a un ritmo casi constante, dando origen al período estacionario del cultivo, que dura dos días y medio.

4.º A partir de los ocho días (ciento noventa y dos horas) se inicia claramente un descenso en la curva (GH); los lactobacilos han agotado los materiales nutritivos del medio, han dado origen a productos de su catabolismo y el medio empieza a serles inadecuado; su capacidad de multiplicación disminuye, sus posibilidades de adaptación son cada vez menores y, por fin, puede decirse que no hay multiplicación, sino sólo supervivencia, hasta que en las siembras no se desarrollan colonias, lo que indica que no quedan lactobacilos vivos en el cultivo; la declinación es lenta primero (GH), rápida después (HI), alcanzándose a los catorce días la esterilización del cultivo. La cifra máxima de acidez producida ha sido del 1,19 por 100 y el pH descendió a 3,6; este descenso es rápido en las cuarenta y ocho primeras horas (de 7 a 5 a las doce horas y a 3 a las cuarenta y ocho horas), después más lento, casi estabilizado.

Variaciones en las cepas.

Con objeto de determinar las posibles diferencias entre las distintas cepas, con respecto a su desarrollo, sometimos a siembra y multiplicación

a la cepa núm. 25-L, en las mismas condiciones que la núm. 16-L. La cepa 25-L se aisló de un cultivo de la 16-L, en el momento de su máxima acidez; hay que suponer, por tanto, que se trata de una cepa resistente a la acidez elevada. En el Cuadro II y en la Gráfica II pueden verse los resultados, de los cuales se deduce, en primer lugar, que el desarrollo sigue, en sus líneas generales, un ritmo idéntico al de la cepa 16-L, aun-



GRÁFICA II.

que con variaciones cuantitativas en la duración de los distintos períodos. El cultivo no está estéril hasta las trescientas ochenta y cuatro horas (dieciséis días), o sea que los lactobacilos conservan su capacidad de multiplicación durante dos días más que los de la cepa 16-L, lo que será consecuencia lógica de su mayor resistencia a la acidez. Las particularidades del desarrollo de la cepa 25-L son las siguientes:

1.ª La fase logarítmica se inicia a las treinta y seis horas, es decir,

con un retraso de doce horas con respecto a la cepa 16-L. A las sesenta horas se alcanza el máximo, es decir, también doce horas después que en la cepa 16-L, lo que demuestra que se mantiene la proporción en el ritmo de aumento. La cifra total máxima es algo más baja en la cepa 25-L, aunque del mismo orden.

2.ª Análogamente a la 16-L, después sobreviene una interrupción en la multiplicación, con el consiguiente descenso, para incrementarse de nuevo y alcanzar un segundo máximo a las ochenta y cuatro horas, o sea doce horas antes. Toda la curva, en este período, se mantiene más alta que en la 16-L y sus descensos son menores, consecuencia de su mayor resistencia a la acidez.

3.ª Continuando el paralelismo, sobreviene un descenso casi al mismo tiempo, y un tercer máximo a las ciento sesenta y ocho horas (treinta y seis horas después que en la 16-L).

4.ª A partir del tercer máximo las curvas se confunden. El descenso de la 25-L es muy lento, por lo que puede considerarse en período casi estacionario hasta las trescientas treinta y seis horas (catorce días) en vez de hasta las ciento noventa y dos horas (ocho días), lo que se debe también, con toda probabilidad, a la mayor resistencia a la acidez.

5.ª A partir de los catorce días el descenso de la curva es brusco y rápido, encontrándose el cultivo estéril a los dieciséis días (trescientas ochenta y cuatro horas), es decir, dos días después que la 16-L.

De todo cuanto llevamos dicho se deduce un paralelismo en el desarrollo de ambas cepas; por consiguiente, puede considerarse que un cultivo de lactobacilos se encuentra en su máxima actividad entre las cuarenta y ocho y las noventa y seis horas, si bien los microorganismos conservan en él su vitalidad hasta los ocho días, y en algún caso hasta los trece-catorce-días. Son observaciones y datos muy dignos de tenerse en cuenta para la inoculación de cultivos puros en las salmueras de aceitunas. Con respecto a la acidez, las cifras totales alcanzadas son, como puede verse en los respectivos cuadros, muy análogas en ambas cepas.

CUADRO I

CULTIVO DE LA CEPA 16-L EN INFUSIÓN DE ALFALFA A pH 7, CON EL 2 % DE GLUCOSA

Horas de cultivo	pH	Gramos por 100 Acidez.	Microorganismos por c. c.
3	—	—	264.330
6	—	—	266.000
9	—	—	418.000
12	5,6	0,09	546.240
24	4,45	0,23	1.605.000.000
36	3,75	0,79	30.530.000.000
48	3,75	0,79	299.760.000.000
60	3,5	0,93	67.680.000.000
72	3,6	1	18.560.000.000
84	3,55	1,06	6.290.000.000
96	3,5	1,06	51.050.000.000
108	3,5	1,06	920.000.000
132	3,5	1,08	61.920.000.000
192	—	—	49.700.000.000
252	—	—	682.000.000
336	3,6	1,19	—

CUADRO II

CULTIVO DE LA CEPA 25-L EN INFUSIÓN DE ALFALFA A pH 7, CON EL 2 % DE GLUCOSA

Horas de cultivo	pH	Acidez. Gramos por 100	Microorganismos por c. c.
12	6,4	0,046	41.200.000
24	5,3	0,088	310.000.000
36	5,25	0,1	1.800.000.000
48	4	0,32	3.700.000.000
60	3,8	0,44	190.000.000.000
72	3,6	0,63	21.700.000.000
84	3,65	0,67	153.000.000.000
96	3,5	0,81	74.600.000.000
108	3,55	0,84	290.000.000
120	3,5	0,88	20.160.000.000
168	3,35	1	36.540.000.000
192	3,4	1,06	20.160.000.000
276	—	—	8.360.000.000
324	—	—	1.368.000.000
248	—	—	690.000.000
384	3,35	1,15	—

II. *Cultivo en infusión de alfalfa, a pH 7, con el 2 por 100 de glucosa, más el 7 por 100 de cloruro sódico.*

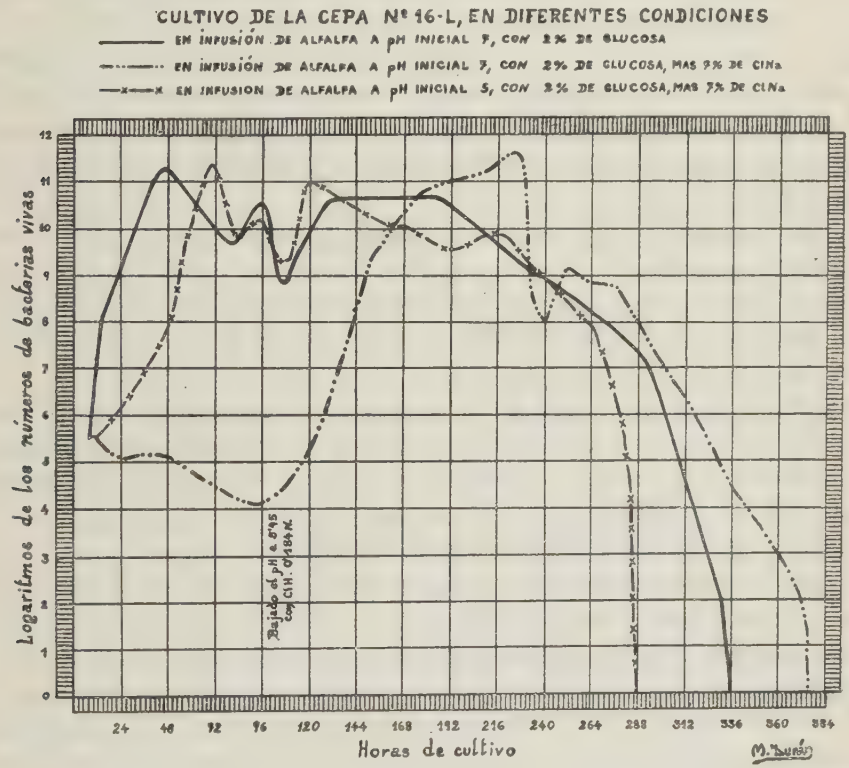
Se realizó esta experiencia con objeto de investigar la influencia de la sal en el desarrollo y multiplicación de *Lactobacillus plantarum*. La cepa utilizada fué también la 16-L. En el Cuadro III se recogen los datos de los conteos, y la curva de crecimiento puede verse en la Gráfica III.

CUADRO III

CULTIVO DE LA CEPA 16-L EN INFUSIÓN DE ALFALFA A pH 7, CON EL 2 % DE GLUCOSA, MÁS 7 % DE ClNa

Horas de cultivo	pH	Acidez. Gramos por 100	Microorganismos por c. c.
12	7,05	—	600.000
24	7,25	—	200.000
36	7,15	—	200.000
48	7,15	—	180.000
60	7,15	0,15	100.000
72	7,15	0,08	45.000
96	7,15	—	15.000
	Bajado con ClH 0,184/N a 5,45		
108	5,45	0,176	24.000
156	4,5	0,274	3.448.000.000
180	3,85	0,56	99.660.000.000
192	3,8	0,56	89.800.000.000
204	3,75	0,57	150.000.000.000
216	3,7	0,54	244.000.000.000
228	4	0.38	548.000.000.000
240	3,65	0,59	114.300.000
252	3,95	0,61	1.781.300.000
264	3,65	0,60	864.000.000
276	3,6	0,68	920.000.000
336	3,6	0,68	160.000
372	3,6	0,72	140

El primer resultado que nos llama la atención es la disminución del número de microorganismos a las veinticuatro horas, con el consiguiente descenso de la curva. Este descenso continúa a las cuarenta y ocho, sesenta, setenta y dos y noventa y seis horas. No cabe duda de que la sal inhibe la multiplicación o, por lo menos, la disminuye considerablemente; el número es cada vez menor y parece que se va hacia una esterilización del cultivo; sin embargo, a las noventa y seis horas aún quedan lactobacilos vivos en el cultivo. Teniendo en cuenta que, en las salmueras de aceitunas, el pH baja rápidamente en las primeras veinticuatro horas y a las cuarenta y ocho horas se encuentran ya números bastante altos de lactobacilos (Izquierdo) (6), se nos ocurrió bajar el pH de nuestro cultivo a 5,45, ya que nuestras observaciones anteriores (4 y 6) nos habían demostrado que con esa cifra de pH empezaban a hacerse patentes los



GRÁFICA III

bacilos lácticos en los recuentos efectuados en salmueras. Dicho descenso se consiguió agregando ClH 0,184/N, y a las doce horas de efectuado se evidenció una multiplicación de lactobacilos que casi duplicaron su número de 15.000 a 24.000 por centímetro cúbico. A las cuarenta y ocho horas (ciento cincuenta y seis después de la siembra) la cifra de recuento subió rápidamente, demostrando que el cultivo se encontraba ya en la fase logarítmica. Este aumento contiuó en días sucesivos, para alcanzar su máximo a los cinco días (ciento veinte horas) (nueve días y medio —doscientas veintiocho horas—desde la siembra). Es de notar que la cifra máxima alcanzada es más alta que en los cultivos anteriores. A partir de este momento tiene lugar un descenso de la curva, debido probablemente a causas análogas a las expuestas anteriormente en el cultivo sin sal. A las ciento cuarenta y cuatro horas (doscientas cincuenta y dos desde la siembra, seis días y diez días y medio, respectivamente) tiene lugar un segundo máximo, descendiendo después la curva, para llegar a la esterilización del cultivo a las trescientas ochenta y cuatro horas, a partir de la siembra (dieciséis días), o sea a las doscientas setenta y seis horas desde la iniciación de la multiplicación (once días y medio). Así, pues, podemos resumir las consecuencias de esta experiencia en los siguientes puntos:

1.° A un pH neutro $\doteq$ 7, la sal inhibe la multiplicación de los lactobacilos.

2.° Con un pH ácido = 5, los lactobacilos se multiplican a un ritmo normal y su curva de crecimiento sigue un trazado análogo al del cultivo sin sal.

3.° El descenso del pH que tiene lugar en las salmueras, a las veinticuatro horas hace posible la multiplicación y desarrollo de los lactobacilos. Dicho descenso rápido del pH se debe a la salida de ácidos orgánicos de las aceitunas, formados en su mayoría durante el cocido y los lavados (véase R. de la Borbolla y colaboradores) (2).

4.° Según demuestra la curva, el cultivo pasa por dos períodos de relativa estabilidad: uno, con tendencia al aumento entre las ciento ochenta y doscientas veintiocho horas (setenta y dos y ciento veinte desde el comienzo de la multiplicación), y otro con tendencia a la disminución entre las doscientas cincuenta y dos y doscientas setenta y seis horas (ciento cuarenta y cuatro y ciento sesenta y ocho, respectivamente, a partir de la iniciación del aumento con el descenso del pH).

III. *Cultivo en infusión de alfalfa, a pH 5, con el 2 por 100 de glucosa, más 7 por 100 de cloruro sódico.*

De la experiencia anterior parece deducirse que, para que los lactobacilos se multipliquen en un medio salino, es preciso un pH ácido; planteamos una nueva experiencia preparando un medio con el 7 por 100 de ClNa y con un pH original de 5. La cepa utilizada es también la 16-L. Los resultados se ofrecen en el Cuadro IV y en la Gráfica III. Las características de este cultivo, en comparación con el realizado sin sal, son las siguientes:

1.ª Tras un período de latencia se inicia el de multiplicación lenta, más lenta que en la experiencia I, lo que hace más larga la duración de la fase AB. La fase logarítmica se inicia a las cuarenta y ocho horas y culmina en la cifra máxima, que tiene lugar a las setenta y dos horas, es decir, veinticuatro horas después que en el cultivo sin sal. Este retardo de tiempo se debe, seguramente, a dificultades en la multiplicación, que sigue un ritmo más lento.

2.ª A partir de las setenta y dos horas se inicia un descenso, que alcanza su máximo a las ochenta y cuatro horas, coincidente con la experiencia I, lo mismo que el ascenso que tiene lugar a continuación; la fase BC tiene, pues, una duración más corta, tan sólo doce horas contra veinticuatro en I. En el período de doce horas que sigue se produce una subida (CD) de la curva, que culmina en el segundo máximo a las noventa y seis horas, el cual queda por bajo con relación al del cultivo sin sal. Análogamente vienen ahora las fases de descenso DE y ascenso EF, culminando el tercer máximo a las ciento veinte horas (doce horas antes que en I).

3.ª La fase FG, de relativa estabilización, que sigue ahora se caracteriza por un ritmo constante de descenso hasta las doscientas dieciséis horas (nueve días), como en I. Es digna de notar la analogía de esta fase con la registrada en la experiencia II; también aquí se distingue un primer período, de las ciento veinte a ciento noventa y dos horas, con tendencia a la disminución, y otro de las ciento noventa y dos a las doscientas dieciséis horas, con tendencia al aumento.

4.ª De las doscientas dieciséis a las doscientas sesenta y cuatro horas tiene lugar un descenso lento (fase GH) y a continuación un rápido decli-

ve (HI), encontrándose estéril el cultivo a las doscientas ochenta y ocho horas (doce días), o sea dos días antes que en la experiencia I.

CUADRO IV

CULTIVO DE LA CEPA 16-L EN INFUSIÓN DE ALFALFA A pH 5, CON EL 2 % DE GLUCOSA, MÁS 7 % DE ClNa

Horas de cultivo	pH	Acidez. Gramos por 100	Microorganismos por c. c.
3	—	—	100.300
6	—	—	149.866
9	—	—	160.800
12	5,1	0,19	420.000
24	5,1	0,2	1.060.000
36	5	0,15	12.300.000
48	4,55	0,21	76.000.000
60	4	0,36	9.100.000.000
72	3,7	0,64	310.660.000.000
84	3,95	0,64	6.800.000.000
96	3,65	0,64	22.460.000.000
108	3,9	0,61	1.980.000.000
120	3,85	0,64	115.000.000.000
168	3,85	0,64	12.640.000.000
192	3,85	0,64	3.213.000.000
216	3,85	0,64	8.870.000.000
240	3,85	0,64	1.563.000.000
264	3,75	0,61	120.000.000
300	3,75	0,61	—

Como resultado final debemos destacar el paralelismo que existe entre el desarrollo de ambos cultivos, sin sal y con sal, con variaciones me-

ramente cuantitativas en la duración de los diferentes períodos. Esto puede observarse con mayor facilidad en el Cuadro V, que se inserta a continuación.

CUADRO V

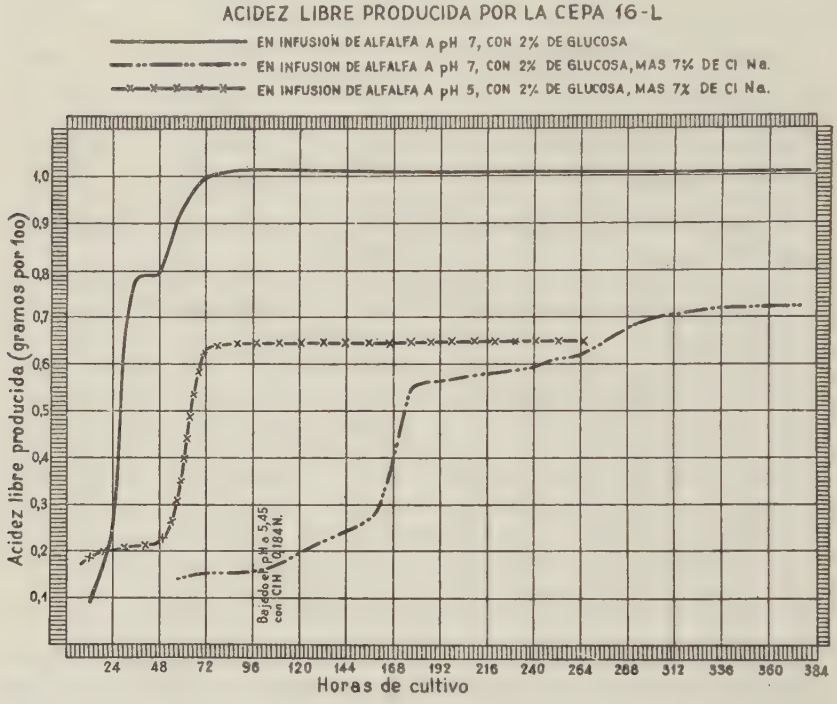
VARIACIONES CUANTITATIVAS ENTRE EL CULTIVO DE LA CEPA 16-L SIN SAL Y CON SAL

	Cultivo sin sal	Cultivo con sal
Iniciación de la fase logarítmica	12 horas	48 horas
Primer máximo	48 horas	72 horas
Duración del primer descenso	36 horas	12 horas
Primer mínimo	84 horas	84 horas
Duración del segundo incremento	12 horas	12 horas
Segundo máximo	96 horas	96 horas
Duración del segundo descenso	12 horas	12 horas
Segundo mínimo	108 horas	108 horas
Duración del tercer incremento	24 horas	12 horas
Tercer máximo	132 horas	120 horas
Duración de la fase de declinación	204 horas	168 horas
Cultivo estéril	14 días	12 días

Es curioso destacar, en este cuadro, el ritmo de doce horas con que se producen los ascensos y descensos en el cultivo con sal. Cada veinticuatro horas se produce un máximo en la curva de crecimiento. El ritmo es más constante que en el cultivo sin sal, en el cual el primer máximo tiene lugar a las cuarenta y ocho horas; del primero al segundo median también cuarenta y ocho horas, pero entre el segundo y el tercero tan sólo treinta y seis horas. En la iniciación de la fase de multiplicación parece, pues, que la sal tiene un efecto retardatario, pero una vez comenzada aquélla parece estimularla y acortar los períodos de descenso.

Variaciones en la producción de acidez.

La acidez libre producida es el signo exterior más interesante en el metabolismo de los lactobacilos; por eso la hemos determinado en nuestros cultivos, apareciendo en los respectivos cuadros, así como el pH. En la Gráfica IV queda reflejada la marcha de la producción de acidez. A este respecto podemos hacer las siguientes observaciones:



Gráfica IV

1.ª En el cultivo a pH 7 con 2 por 100 de glucosa la producción de acidez sube muy rápidamente en las primeras treinta y seis horas (de 0 a 0,79 grs. por 100), se estabiliza un poco y vuelve a subir, alcanzándose el máximo (1,06 grs. por 100) a las ochenta y cuatro horas; después continúa estabiiizada.

2.ª En el cultivo a pH 5 con el 2 por 100 de glucosa y 7 por 100 de

ClNa el ritmo de producción de acidez es más lento, subiendo poco la curva en las primeras cuarenta y ocho horas (de 0 a 0,21 grs. por 100); después sube rápidamente y alcanza el máximo igualmente a las setenta y dos horas: 0,64 grs. por 100. La acidez producida es, por tanto, menor que en el cultivo sin sal.

3.ª En el cultivo a pH 7 con 7 por 100 de ClNa no se produce inicialmente acidez, cosa lógica, ya que tampoco hay multiplicación de lactobacilos; al bajar el pH a 5 e iniciarse el desarrollo va subiendo lentamente la curva de acidez, alcanzando a las trescientas treinta y seis horas un máximo más alto que en el cultivo a pH inicial 5 (0,68 grs. por 100).

Variaciones en la morfología de los lactobacilos.

Diferentes autores (Bergey (1), Pederson (8)) hacen referencia a estas variaciones, según el medio en que se desarrollan; de pasada hemos realizado, igualmente, algunas observaciones a este respecto, de las que queremos dar cuenta brevemente.

Lactobacillus plantarum se presenta, en condiciones normales, como un bacilo aislado o reunido en cortas cadenas o en parejas; así lo hemos observado en los cultivos de cuarenta y ocho horas en infusión de alfalfa con 2 por 100 de glucosa. La longitud de los bacilos es de 2,16 a 2,79 micras y el diámetro 0,8 — 0,9 micras (Lámina I, figs. 1.ª y 2.ª).

Conforme la acidez del medio es mayor, los bacilos tienden a hacerse más largos, tomando formas a veces casi filamentosas; el mismo efecto parece tener la sal y, en general, todas las circunstancias adversas que entorpecen el normal desarrollo; así, en cultivos con 7 por 100 de ClNa de ciento cuarenta y dos horas hemos observado formas en parejas aisladas de 6-6,5-7 y hasta 8 micras de longitud (Lámina I, figs. 3.ª, 4.ª y 5.ª). Ello será debido, probablemente, a que tales circunstancias retardan las divisiones del bacilo, el cual crece, en cambio, en longitud; claro está que con ellos coexisten otros cortos, que pueden ser los adaptados a la acidez y salinidad elevadas, que continúan multiplicándose.

CONCLUSIONES

1.ª En infusión de alfalfa, con el 2 por 100 de glucosa, a un pH 7, *Lactobacillus plantarum* se desarrolla perfectamente, alcanzando el cul-

tivo su máxima actividad entre las cuarenta y ocho y noventa y seis horas.

2.ª A un pH de 7 el ClNa al 7 por 100 impide el desarrollo.

3.ª A un pH de 5 *Lactobacillus plantarum* se desarrolla perfectamente aun en presencia de ClNa, a una concentración del 7 por 100; su ritmo de desarrollo es inicialmente más lento que en el cultivo sin sal.

4.ª La producción de acidez libre es menor en el cultivo con sal. El máximo se alcanza a las setenta y dos-ochenta y cuatro horas.

RESUMEN

Se hace un estudio de la influencia del pH y la sal en el desarrollo de *Lactobacillus plantarum,* empleando el método de cultivos puros en infusión de alfalfa con el 2 por 100 de glucosa. Con un pH inicial de 7 el microorganismo se desarrolla perfectamente, alcanzando el máximo entre las cuarenta y ocho y las noventa y seis horas; la curva de crecimiento sigue las vicisitudes normales en todo cultivo bacteriano. En un medio con el 7 por 100 de ClNa no se desarrolla si el pH es de 7; en cambio lo hace inmediatamente si se baja el pH a 5; si el medio tiene ya, inicialmente, este pH el lactobacilo se desarrolla aún en presencia del 7 por 100 de ClNa, si bien su ritmo inicial de multiplicación es más lento. Esto se relaciona con lo que ocurre en las salmueras de aceitunas, en las que el pH baja en las primeras veinticuatro horas, haciendo posible el desarrollo de los lactobacilos. La producción de acidez libre alcanza un máximo de 1,06 grs. por 100 a las ochenta y cuatro horas; en presencia de sal el máximo alcanzado es menor, tan sólo de 0,64 grs. por 100.

SUMMARY

In the present paper it is made a study of the pH influence and the salt in the development of *Lactobacillus plantarum,* using the method of pure cultures in alfalfa infusion with the 2 per cent of glucose. With a pH initial of 7, the microorganism is spreaded perfectly, coming up to the maximum between the 48 and the 96 hours; the growth curve follows the normal ups and down in all bacterian culture. In a medium with

the 7 per cent of ClNa, it is not developed when the pH is 7; instead it is developed inmediately if it is come down to a pH 5. In case that the medium has all along this pH, the *Lactobacillus* is developed yet in presence of the 7 per cent of ClNa, although its initial rhythm of propagation is more slow. This is related with that what take place in the brines of olive, in which the pH come down in the first 24 hours, making possible the development of *Lactobacillus*. The free acidity production reach a maximum of 1.06 gr. at the 84 hours; in salt presence the maximum reached is smaller, only of 0.64 gr. per cent.

BIBLIOGRAFIA

1. R. S. Breed, E. G. D. Murray y A. P. Hitchenes. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Sixth edition. Williams & Wilkins Company. Baltimore. 1948.
2. J. M. R. de la Borbolla y Alcalá, C. Gómez Herrera, R. Guzmán y R. Vázquez. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. VII. Efectos del tratamiento con lejía. Anales de la R. Soc. Esp. de Física y Química (Madrid). 48 B., páginas 427-30. 1952.
3. J. M. R. de la Borbolla y Alcalá, C. Gómez Herrera y A. Izquierdo Tamayo. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XI. Empleo de cultivos puros de lactobacilos. Anales de la R. Soc. Esp. de Física y Química. Tomo L. Serie B, núm. 5, pág. 497. Mayo. 1954.
4. A. Izquierdo Tamayo. Fermentación microbiana en el aderezo de aceitunas verdes. Microbiología Española. 6. 4. Octubre-diciembre. 1953.
5. A. Izquierdo Tamayo. Microbiology of Spanish-type green olives (Comunicación presentada al VI Congreso Internacional de Microbiología). Roma. Septiembre. 1953.
6. A. Izquierdo Tamayo. La población microbiana de las salmueras de aceitunas. Microbiología Española. 8. 1. Enero-marzo. 1955.
7. J. S. Molina y A. H. Merzari. Influencia del aceite esencial de hinojo en el proceso fermentativo de aceitunas verdes «tipo español». III. Acción sobre los lactobacilos homofermentativos. Revista Argentina de Agronomía. 18. 4. Diciembre. 1951.
8. C. S. Pederson. A study of the species *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. Journal of Bacteriology. 31, págs. 217-24. 1936.
9. W. W. C. Topley, G. S. Wilson y A. A. Miles. Bacteriología e inmunidad (Traducción española de J. Estellés). Salvat editores. Barcelona. 1953.

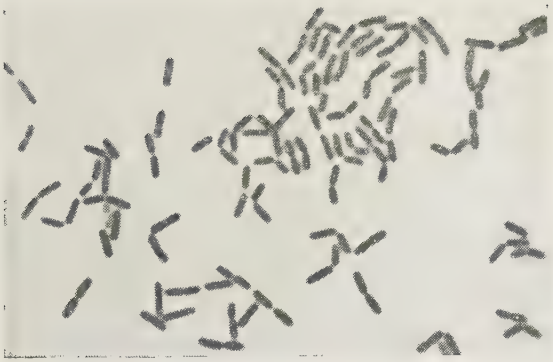


FIG. 1.

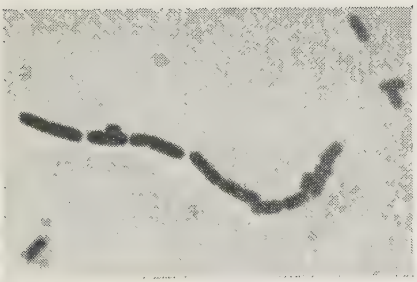


FIG. 2.

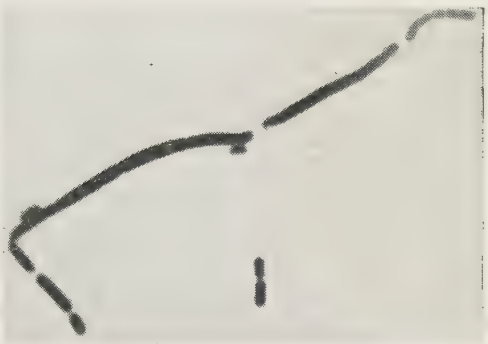


FIG. 4.

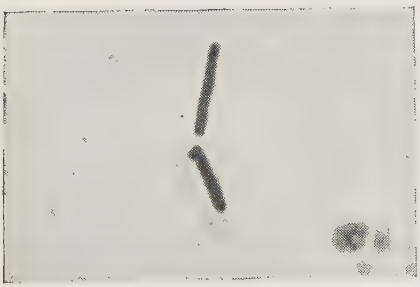


FIG. 3.

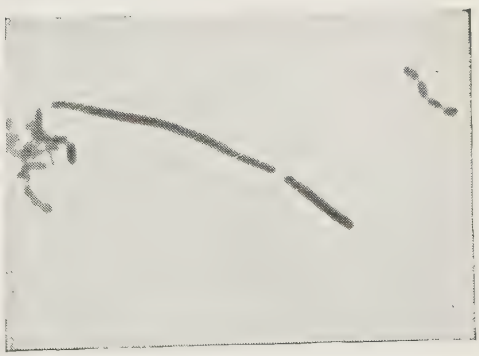


FIG. 5.

FIGS. 1 y 2.—Cultivo de veinticuatro horas en infusión de alfalfa a pH 7 con el 2 por 100 de glucosa. Formas normales.

FIGS. 3, 4. y 5.—Formas alargadas en cultivos de ciento sesenta y dos horas, con 7 por 100 de cloruro sódico y una acidez libre de 0,64 grs. por 100.

(Aumentos: 2.000 ×).

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LA PUTREFACCION EN LA MERLUZA

POR

GENOVEVA TEJERINA DOMÍNGUEZ

INTRODUCCION

En la mayor parte de los países, y muy especialmente en aquellos, como el nuestro, de gran desarrollo costero, ha llegado a alcanzar un interés notable en la alimentación el consumo en fresco de animales acuáticos, tanto de origen fluvial como marino. En este aspecto es de gran importancia para la economía nacional el período de conservación del pescado, así como los agentes causantes de su alteración.

En la clasificación que hace Barcrof de los alimentos según su período de conservación, incluye al pescado en el tercer grupo, por ser de los que se conservan durante el tiempo más limitado y siempre que se le proporcionen las condiciones adecuadas.

Olley y Lovern, Connel, Shewan y otros indican los compuestos químicos que integran el músculo de pescado, compuestos que son perfectamente apropiados para permitir el desarrollo de diversos tipos de bacterias que, en definitiva, son las responsables de todas o casi todas las alteraciones que en él se presentan.

Con algunas variantes, el pescado, en general, contiene cantidades diversas de glucógeno, dependiendo, en parte, del esfuerzo a que se le ha obligado durante su captura; también encierra lípidos y en gran proporción proteínas, junto con factores del complejo B y otros varios compuestos que favorecen la actuación de los agentes de su alteración.

Desterrada la primitiva creencia de que el ambiente marino es incapaz de albergar alguna bacteria, fueron Zobell y Upham quienes ca-

talogaron todas las especies del mar, estableciendo ciertas diferencias generales respecto a las bacterias del suelo. Aparte de esta flora acompañante del pescado, hay que suponer en él la presencia de nuevas bacterias en relación con los medios de transporte y con la higiene de las personas y lugares con los que tiene contacto. Stewart señaló el incremento en bacterias contaminantes a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la captura del pescado hasta su venta en el mercado.

A lo largo de todo el siglo se ha venido prestando gran atención al estado bacteriológico del músculo del pescado, y después de numerosas experiencias realizadas por diversos investigadores (Muller, Bruns, Hunter, Reay, Bedford, Aschehoug y Vesterhus, etc.) se ha llegado a admitir que el tejido muscular del pescado fresco es estéril, quedando limitada la presencia de microorganismos a sus branquias, intestino y cubierta mucosa. Fellers y Hunter estudian la penetración de estas bacterias en el músculo para iniciar así el proceso de putrefacción, una vez alejado el pescado de su medio normal. Las bacterias más significativas en este aspecto han sido señaladas por Schönberg, Hoffstadt y Aschehoug y Vesterhus, entre otros.

Shewan clasifica la putrefacción del pescado, de acuerdo a sus caracteres organolépticos y determinados cambios químicos, en cuatro fases, fijando la duración conjunta de todas ellas en veinte días. Señala cierta relación entre el número de bacterias presentes a lo largo de todo el proceso y determinados compuestos químicos producidos durante el mismo, pero sin llegar a concretar la intervención de los diversos tipos bacterianos con los distintos cambios que experimenta el material en putrefacción.

En el presente trabajo comenzamos haciendo un estudio bacteriológico cualitativo de la merluza *(Merlucius merlucius),* utilizando muestras facilitadas por el Departamento de Investigaciones Bromatológicas de Madrid. Sobre estas muestras, que conservamos (dentro de recipiente cerrado) en nevera a 4° C., estudiamos seguidamente todo el proceso de putrefacción bacteriana, investigando los distintos tipos de bacterias que por sus características fisiológicas son capaces de alterar un grupo determinado de compuestos químicos, y fijando la naturaleza de los mismos, así como la de los nuevos cuerpos originados en su transformación.

Para ello hemos recurrido a una serie de medios selectivos de cultivo en los que sembramos las bacterias procedentes de la merluza en distin-

tas fases de putrefacción, observando si estas bacterias son o no capaces de transformar el substrato que el medio les proporciona, y en caso positivo la naturaleza de tal transformación.

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Utilizamos merluza eviscerada que, recogida en recipientes de vidrio estéril, se ha conservado en nevera a 4° C. durante el tiempo de duración de la experiencia, que ha sido dividida en dos partes:

A) Análisis bacteriológico cualitativo de la merluza, en las condiciones en que se adquiere.

B) Grupos fisiológicos de bacterias y número de las mismas, que intervienen en las diversas fases de alteración de la merluza conservada a 4° C.

A)

Tomamos una muestra media que participa de las partes inferior, central y superior de la merluza, operación efectuada en condiciones estériles y seguida de la colocación de tal muestra en un matraz, asimismo estéril, donde se agita durante quince-veinte minutos con un volumen de agua igual a tres veces el peso de la muestra. De la suspensión así obtenida sembramos directamente en placas de agar común para aislamiento de aerobios y en tubos de Holl y de Túng para desarrollo de anaerobios. Unas y otros se incuban a 25° C.

Partiendo de las siembras en placa obtenemos cultivos puros, de cada uno de los cuales se hace el examen macroscópico de colonias, así como su estudio morfológico, coloración al Gram y movilidad en cultivo en caldo de unas horas. Se observan, además, sus caracteres culturales y fisiológicos en diversos medios diferenciales.

Los resultados de todas estas pruebas nos han permitido formar diversas cartas de identificación, de las cuales dieciséis han resultado distintas y son las que presentamos a continuación.

En los tubos de Holl sembrados se observa a las veinticuatro horas de cultivo una intensa turbidez y bastante sedimento, y en los de Túng ligero crecimiento, que a las cuarenta y ocho horas llega a ser abundantísimo, revelando por tinción los bacilos Gram positivos que aparecen en la figura núm. 8.

CARTA NUM. 1

Colonias en agar.	Forma esférica regular, bordes continuos, diámetro inferior a 1 mm., ligeramente brillantes.
Morfología.	Bacilos cortos (figura núm. 1).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	No indol.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	No acetilmetilcarbinol.
Leche tornasolada.	Negativa.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 2

Colonias en agar.	Muy abundantes, puntiformes, opacas.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Positivo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	No indol.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Negativa.
Glucosa.	Fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	Fermenta.

CARTA NUM. 3

Colonias en agar.	Esféricas, borde irregular ligeramente lobulado, algo blanquecinas y de 1 a 3 mm. de diámetro.
Morfología.	Bacilos grandes (figura núm. 2).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez y velo ligero.
Gelatina.	Fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Reducción.
Glucosa.	Fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 4

Colonias en agar.	De 1 mm. de diámetro aproximadamente, borde continuo, color amarillo-rosáceo, brillantes.
Morfología.	Cocos.
Gram.	Positivo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez, con algún sedimento.
Gelatina.	Fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Reducción.
Glucosa.	Fermenta.
Lactosa.	Fermenta.
Maltosa.	Fermenta.
Manosa.	Fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 5

Colonias en agar.	Diámetro inferior a 1 mm., opacas, blanquecinas, bordes lisos.
Morfología.	Bacilos cortos (figura núm. 3).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez.
Gelatina.	Fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 6

Colonias en agar.	Opacas, de unos 5 mm. de diámetro, borde continuo, superficie plana.
Morfología.	Bacilos gruesos.
Gram.	Positivo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Ligera turbidez.
Gelatina.	Fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Negativa.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación ácida.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 7

Colonias en agar.	Pequeñas, abundantes, puntiformes, de aspecto cremoso.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez.
Gelatina.	No fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación ácida.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 8

Colonias en agar.	De 2 a 3 mm. de diámetro, bordes irregulares, opacas.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Intensa turbidez.
Gelatina.	No fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Negativa.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación ácida.
Glucosa.	Fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	Fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 9

Colonias en agar.	De 2 a 4 mm., cremosas, punteadas, borde ondulado, ligeramente convexas.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez con ligero sedimento.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Reducción.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 10

Colonias en agar.	Opacas, borde regular, color pardo-violáceo, diámetro inferior a 1 mm.
Morfología.	Bacilos largos (figura núm. 4).
Gram.	Positivo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez y velo.
Gelatina.	Fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Alcalización.
Glucosa.	Fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 11

Colonias en agar.	Abundantes, color intensamente violáceo que no comunica al medio, ligero brillo, borde regular.
Morfología.	Bacilos (fig. n.º 5).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez y sedimento.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Negativa.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación.
Glucosa.	Fermentación.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	Fermentación.
Manosa.	No fermentación.
Sacarosa.	No fermentación.

CARTA NUM. 12

Colonias en agar.	De 1 a 2 mm., bordes irregulares, brillo azulado, zonas de crecimiento.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez y sedimento.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación.
Glucosa.	Fermentación.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	Fermentación.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 13

Colonias en agar.	Color rosa-violáceo, bordes continuos, elevadas en el centro, ligeramente brillantes, diámetro aproximado de 1 mm.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez, velo ligero.
Gelatina.	No fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Alcalinización.
Glucosa.	Fermentación.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

CARTA NUM. 14

Colonias en agar.	De 2-5 mm. de diámetro, cremosas con bordes transparentes, contorno muy irregular.
Morfología.	Bacilos (fig. n.º 6).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez, algo sedimento.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación ácida.
Glucosa.	Fermentación.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	Fermentación.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	Fermentación.

CARTA NUM. 15

Colonias en agar.	De 1 a 2 mm. de diámetro, no abundantes, ligeramente convexas, bordes lisos, tono algo dorado.
Morfología.	Bacilos (fig. n.º 7).
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Positiva.
Caldo común.	Turbidez.
Gelatina.	Fluidificación.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Coagulación ácida.
Glucosa.	Fermentación.
Lactosa.	Fermentación.
Maltosa.	Fermentación.
Manosa.	Fermentación.
Sacarosa.	Fermentación.

CARTA NUM. 16

Colonias en agar.	Color pardusco, translúcidas, lisas.
Morfología.	Bacilos.
Gram.	Negativo.
Movilidad.	Negativa.
Caldo común.	Turbidez, velo muy ligero.
Gelatina.	No fluidifica.
Agua de peptona.	Negativa.
Nitratos.	Reducción.
Voges-Proskauer.	Negativa.
Leche tornasolada.	Negativa.
Glucosa.	No fermenta.
Lactosa.	No fermenta.
Maltosa.	No fermenta.
Manosa.	No fermenta.
Sacarosa.	No fermenta.

B)

Utilizamos la misma merluza indicada en el apartado anterior, procurando en este caso que las muestras tomadas sean lo más análogas posibles para todas las experiencias; en la mayoría de ellas su peso oscila alrededor de los treinta gramos.

La muestra tomada se lleva a un mortero estéril, donde se tritura perfectamente a la vez que se añade por cada diez partes 100 c. c. de agua destilada estéril. La masa resultante se agita enérgicamente unos diez minutos, al cabo de los cuales se deja sedimentar para servirnos del líquido sobrenadante que resulta, que es el punto de partida para la preparación de nuevas suspensiones de concentración decreciente. Los límites de estas diluciones fueron variados en el curso del trabajo entre 10^{-1} y 10^{-17}, de acuerdo con el momento en que se efectuó la determinación y con la mayor o menor actividad de los diversos grupos bacterianos. Las primeras determinaciones diferían entre sí veinticuatro horas, después se sucedieron cada cuarenta y ocho y, finalmente, a los tres días, hasta completar los veinte que habían sido señalados.

Las siembras de cada serie de diluciones preparada se lleva a cabo en los medios que indican las acciones siguientes:

Utilización de pectina.
Utilización de proteínas.
Fermentación de urea.
Desnitrificación.
Fluidificación de gelatina.
Fermentación de glucosa.
Fermentación de lactosa.
Producción de SH_2.
Producción de indol.
Formación de ácido butírico.
Producción de acetilmetilcarbinol.
Crecimiento de anaerobios.
Fermentación de maltosa.

Se cultiva en estufa a 25° C., y el reconocimiento de los productos formados se hace mediante sus correspondientes reactivos químicos (subacetato de plomo, para el sulfhídrico; reactivo de Ehrlich, para el indol, etcétera).

Los productos que empleamos en la preparación de los medios de cultivo y reactivos químicos son de máxima garantía.

El indicador de pH utilizado en los caldos azucarados es el bromocresol púrpura.

Para las observaciones microscópicas hemos empleado un microscopio Zeiss, y los fotografías que presentamos han sido realizadas con una máquina Leica.

La determinación del pH se practica en la masa resultante de la trituración de la merluza en mortero, empleando para ello un medidor Torres Quevedo mod. EE.51-01, núm. 159.

Los resultados obtenidos en estas pruebas son los que figuran en el cuadro siguiente:

RESULTADOS DE LOS ANALISIS EFECTUADOS DURANTE LAS

(NÚMERO DE BAC

TOMAS DE MUESTRAS	24 horas	3 días	5 días
pH de la muestra	6,8	6,9	7,05
Fluidificación de gelatina	10^6	10^7	10^7
Utilización de proteínas	10^6	10^7	10^7
Fermentación de urea...	10^6	10^8	10^8
Desnitrificantes	10^7	10^7	10^8
Productores de SH_2	10^3	10^3	10^5
Productores de indol	—	—	—
Anaerobios	10^3	10^2	10^3
Utilización de pectina	—	—	—
Fermentadores de Glucosa	10^6 (A y G)	10^7 (A y G)	10^8 (A y G)
Productores de acetilmetilcarbinol.	10^3	10^2	10^4
Fermentadores de maltosa....	10^6 (A y G)	10^7 (A y G)	10^6 (A y G)
Fermentadores de lactosa	10^5 (A y G)	10^7 (A y G)	10^6 (A y G)
Productores de butírico	10^8	10^7	10^7

INTERPRETACION

El análisis bacteriológico de la superficie del pescado nos ha permitido el aislamiento de dieciséis especies de bacterias, tanto de forma cocácea como bacilar, si bien, de acuerdo con Zobell y Upham, son estas últimas las que predominan, como también las Gram negativas, que alcanzan una proporción superior a 70 por 100.

La mayor parte de ellas son móviles, resultado que concuerda con Schönberg, así como su facilidad para fluidificar la gelatina y desarrollarse a 25° C.

DIVERSAS FASES DE ALTERACION DE LA MERLUZA A 4º C.

TERIAS POR GRAMO)

7 días	10 días	13 días	16 días	20 días
7,4	7,8	8,0	8,4	8,3
10^7	10^7	10^9	10^9	10^{11}
10^7	10^7	10^9	10^8	10^7
10^8	10^8	10^{10}	10^{13}	10^{15}
10^8	10^9	10^9	10^8	10^{13}
10^6	10^7	10^9	10^{10}	10^8
—	—	—	—	—
10^5	10^7	10^7	10^7	10^6
—	—	—	—	—
10^{11} (A y G)	10^{10} (A y G)	10^9 (A y G)	10^{11} (A y G)	10^{11} (A y G)
10^7	10^9	10^{10}	10^8	10^8
10^7 (A y G)	10^9 (A y G)	10^{11} (A y G)	10^{13} (A y G)	10^8 (A y G)
10^6 (A y G)	10^8 (A y G)	10^{10} (A y G)	10^{10} (A y G)	10^{10} (A y G)
10^8	10^8	10^8	10^9	10^8

En general dominan las bacterias proteolíticas y aquellas que presentan capacidad reductora de nitratos, acciones ambas que hemos de considerar interesantes en cuanto se refiere al proceso inmediato de la putrefacción y elevación del pH.

Por las determinaciones efectuadas durante el proceso de putrefacción de la merluza, podemos observar, en primer lugar, la ausencia del tipo de bacterias capaz de utilizar pectina o productos afines. Tampoco hemos podido demostrar la presencia de los organismos productores de indol, a pesar de la significación que Clough les concede en esta alteración. Existen, en cambio, los que modifican la glucosa hasta acetilmetil-

carbinol, que se encuentran en número máximo en la determinación correspondiente al décimotercero día.

Los organismos que actúan sobre sustancias hidrocarbonadas aumentan en número hasta alcanzar los trece-dieciséis días, correspondiendo los valores más altos, en un principio, a los fermentadores de glucosa, que luego son superados por los que fermentan maltosa, mientras que los que actúan sobre lactosa se mantienen constantes en las últimas determinaciones.

De los restantes organismos, son los que fermentan la urea los que tienden a los valores más elevados, seguidos de cerca por los desnitrificantes. Puede observarse, a lo largo de toda la putrefacción, un gran paralelismo entre dos acciones, que son la utilización de proteínas y fluidificación de gelatina, que sólo se interrumpe por predominio de esta última al final del proceso.

Las bacterias productoras de SH_2 son muy poco abundantes en las primeras determinaciones, así como el grupo de anaerobios proteolíticos, a los que, según Hoffstadt, se podría conceder un significado especial en el almacenamiento del pescado.

Entre todos los cambios que la merluza experimenta, es el que determina la producción de butírico al que corresponde mayor constancia.

RESUMEN

Hacemos un análisis bacteriológico de merluza que nos permite aislar dieciséis especies distintas de bacterias. También seguimos todo su proceso de putrefacción a 4° C., determinando los grupos de bacterias de diferente acción fisiológica que en él intervienen, y la variación que en número experimentan durante el mismo.

SUMMARY

In a bacteriological annalisis sixteen different bacterial species were isolated from *Merlucius merlucius*. Afterwards the whole process of decay at 4° C. was followed determining the bacterial physiological groups and the variation in number of bacteria during the process.

BIBLIOGRAFIA

ASCHEHOUG, V. and VESTERHUS, R. 1943. Investigation of the bacterial flora of fresh herring. Z. Blatt Bakt. 106.

CONNEL, J. J. 1954. Studies on the proteins of fish. Bioch. Jour. 55, n.º 4.

FELLERS, C. R. 1926. Bacteriological investigations on raw salmon spoilage. Univ. Washington Publ. in Fish. 1.

HOFFSTADT, R. E. 1924. Amer. J. Hyg., 4.

HUNTER, A. C. 1920. Bacterial descomposition of salmon. Jour. Bact., 5.

LOVERN, J. A. 1953. The lipids of Fish. Bioch. Jour. 55, n.º 4.

PROCTOR, B. E. and NICKERSON, J. T. R. 1935. An investigation of the sterility of the tissues. Journ. Bact. 30.

SANZ, F., y VARELA, M. G. 1954. Determinaciones analíticas en la inspección del pescado. Vet. Tec. Esp. I. A., III, n.º 7.

SCHONBERG, F. 1938. Uber die wissenschaftlichen Grunlagen zu der Frischerhaltung der Seefische Vorratspflege Lebensmitteforsch. Bd. 1.

SHEWAN, J. M. 1954. The bacteriology of dehydrated fish. Jour. Hyg. 52, n.º 2.

TANNER, F. W. 1944. The microbiology of foods. Garrard Press. Illinois.

STEWART, M. M. 1934. The bacterial flora of market fish. Dep. of Scient. and Ind. Res., Rep. of Food Invest. Board.

TARR, H. L. A. 1954. Microbiological deterioration of fish post mortem, its detection and control. Bact. Reviews. 18.

VARELA, G., y WOJCIECH, R. 1956. Sobre algunos procesos bioquímicos en la descomposición de la merluza. Ann. Brom. VIII, n.º 1.

ZOBELL, G. E. 1946. Marine Microbiology. Waltham, Mass., U. S. A.

ZOBELL, G. E., and UPHAM, H. C. 1944. A list of marine bacteria including descripstions of sixty new species. Bull. Scrps. Inst. Oceanogr. 5.

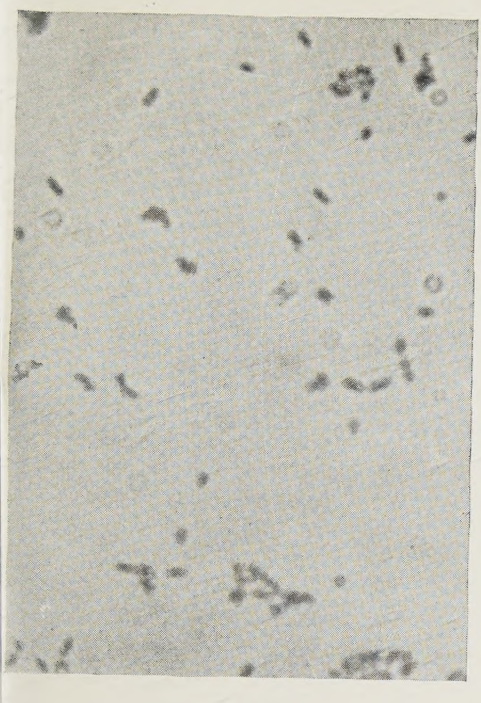


FIG. 1.

FIG. 2.

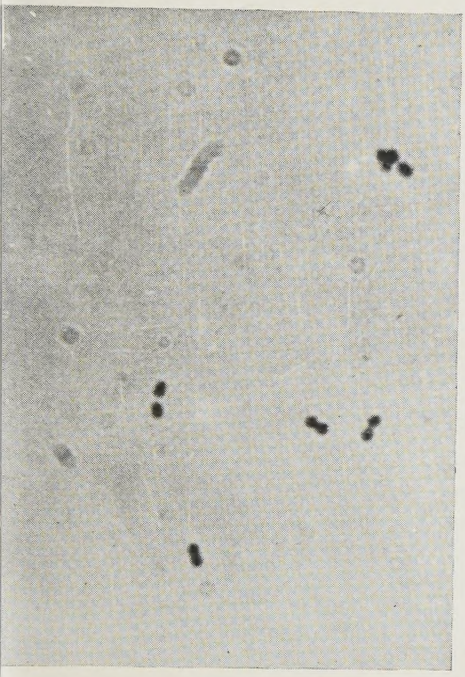


FIG. 3.

FIG. 4.

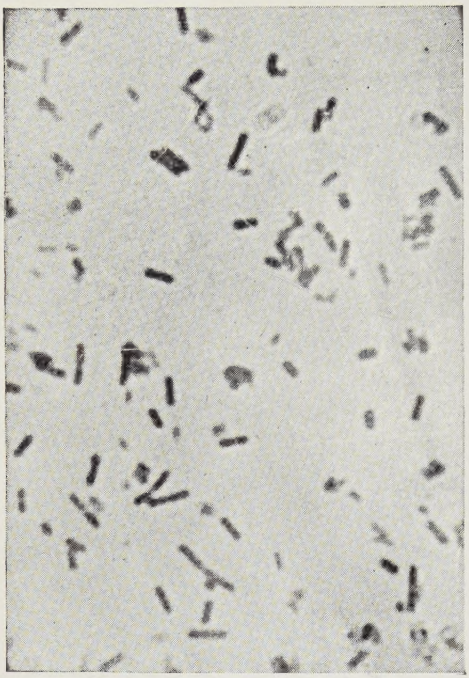


FIG. 5.

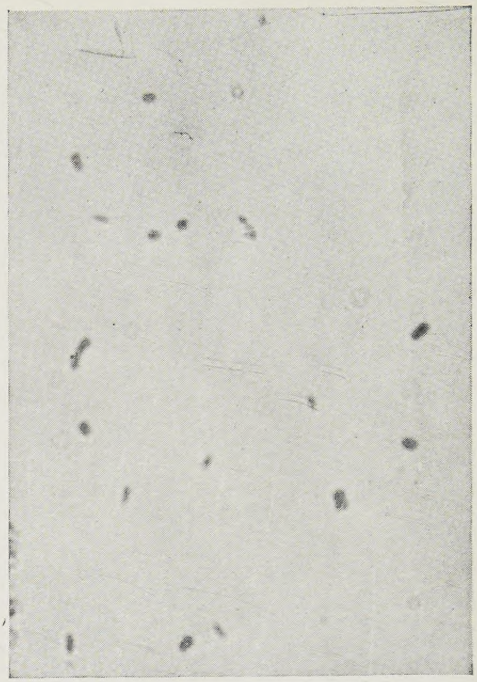


FIG. 6.

FIG. 7.

FIG. 8.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

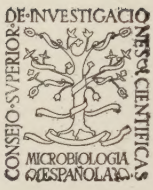
Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó JOAQUÍN COSTA, 32
MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 - Teléf. 21 31 61 - MADRID


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA